



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

“Evaluación de la respuesta inmune y parámetros productivos a la administración de paredes celulares de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* en dietas de pollo de engorda contaminadas con micotoxinas”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
CARLOS MENDIETA RAMÍREZ

TUTORES PRINCIPALES

DRA. GABRIELA GUADALUPE GÓMEZ VERDUZCO
FMVZ-UNAM

DR. ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ
FMVZ-UNAM

DR. JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA
FES-CUAUTITLAN-UNAM

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi mamá, por apoyarme siempre y enseñarme a superar las pruebas que me ha puesto la vida, por más difíciles que sean, gracias por todo Bertis. Este logró también es tuyo.

A mis hermanos Cecilia y Elías, por su apoyo y cariño que me ha ayudado a salir adelante, los quiero mucho.

A mi gran amor Perla, gracias por ser mi confidente y mi cómplice en todo lo que se me ocurre, por apoyarme en mis proyectos personales y darme siempre esas palabras de aliento que necesito para no desistir hasta lograr mis metas. Eres mi más grande motivación en la vida. TE AMO.

A mi papá Elías y Rosalía, porque aunque físicamente ya no están con nosotros, siempre los llevo en el corazón.

A mis sobrinos Dana Valeria y Carlos Alberto, por su cariño incondicional, gracias por recordarme que la vida es para reír y disfrutarse a cada momento.

A todas aquellas personas que han sido parte importante de mi vida, familiares y amigos con los que he pasado muy buenos momentos, ustedes saben quiénes son. Gracias por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, de la cual es un orgullo ser parte.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarme una formación profesional y por darme la oportunidad de estudiar la mejor carrera del mundo.

Al CONACYT, por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

A la Dra. Gabriela Gómez Verduzco, por ser mi tutor y brindarme la oportunidad y la confianza para llevar a cabo este proyecto. Gracias por los consejos, por la amistad y por motivarme para salir siempre adelante.

Al Dr. Ernesto Ávila González, por su apoyo y por sus valiosos consejos y enseñanzas que me ha dado durante todo este tiempo que tengo de conocerlo, es un gran maestro y una excelente persona.

Al Dr. Juan Carlos del Río, por sus enormes aportaciones, comentarios y observaciones para realizar este trabajo de la mejor manera.

A los miembros del jurado, Dr. Antonio Díaz, Dra. Gabriela Bárcenas, Dra. Irma Tejada y Dr. Mariano González, porque con sus conocimientos y valiosos comentarios ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al CEIEPAv, por brindarme las facilidades y el apoyo para la realización del proyecto. Especialmente al doctor Arturo Cortes, por sus aportaciones para mejorar este trabajo.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, y a todos los doctores que ahí laboran, que me ayudaron durante mi formación profesional en el área de la avicultura. Especialmente a la Dra. Magdalena Escorcia, por apoyarme siempre y por darme los consejos que me han ayudado a ser un mejor profesional. Gracias por su amistad doctora.

A los doctores Omar Hernández Ramírez, Yolanda Romero Sánchez y Juan Carlos del Río, de la FES Cuatitlán, por su valioso apoyo, ya que sin este no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A la empresa Nutek S.A. de C.V., especialmente al Ing. Juan Carlos Medina y José Antonio Fierro, por el gran apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la empresa Safmex, por el patrocinio de una parte de este estudio.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de las paredes celulares de levaduras (PCL) de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) en dietas para pollo de engorda contaminadas con aflatoxina B1 (AFB1) y ocratoxina A (OTA), se realizó este estudio y así poder determinar si contrarrestan el efecto de las micotoxinas cuando se presentan solas o en combinación, así como su efecto en parámetros productivos y sistema inmune. Se emplearon 216 aves de sexo macho de 1-21 días de edad, las cuales se distribuyeron completamente al azar en 8 tratamientos con 3 réplicas de 9 pollos cada una, los cuales consistieron en: 1) dieta Testigo; 2) Testigo + 350 µg/kg de AFB1; 3) Testigo + 350 µg/kg de OTA; 4) Testigo + 1,500 ppm de PCL; 5) Testigo + 350 µg/kg de AFB1 + 350 µg/kg de OTA; 6) Testigo + 350 µg/kg de AFB1 + 1,500 ppm de PCL; 7) Testigo + 350 µg/kg de OTA + 1,500 ppm de PCL y 8) Testigo + 350 µg/kg de AFB1 + 350 µg/kg de OTA + 1,500 ppm de PCL. Las aves se alojaron en condiciones de ambiente controlado en baterías Petersime. Las dietas fueron con base en sorgo+soya. El agua y el alimento se administraron a libre acceso. Semanalmente se midieron peso de las aves, consumo de alimento, ganancia de peso e índice de conversión. Para evaluar la respuesta inmune humoral se inmunizaron las aves con una vacuna simultánea de enfermedad de Newcastle (ENC) vía subcutánea y vía ocular (cepa La Sota) al día 8 de edad. Se tomaron muestras de sangre antes de la vacunación y a los 14 días post-vacunación. La respuesta inmune celular se evaluó a los 21 días de edad, mediante una prueba de hipersensibilidad tardía, como respuesta a la inoculación intradérmica con fitohemaglutinina. Las aves se sacrificaron a los 22 días de edad. Se colectaron muestras de contenido intestinal para determinar niveles de IgA, mediante la técnica de ELISA. Se tomó el peso relativo de timo, bazo y bolsa de Fabricio (BF). Se colectaron muestras de sangre con anticoagulante para realizar un hemograma y determinar conteo celular. Los resultados del comportamiento animal, mostraron diferencia ($P < 0.05$) en el peso y ganancia de peso, en los tratamientos AFB, OTA y AFB+OTA fueron menores. La adición de las PCL contrarrestó el efecto negativo de las micotoxinas, principalmente cuando estaba una micotoxina presente. En la respuesta inmune, la cantidad de IgA en contenido intestinal y en la respuesta inmune celular, se observaron diferencias entre los tratamientos ($P < 0.05$), siendo más alta en las dietas que contenían PCL. La adición de PCL en la dieta mostró un efecto positivo en la respuesta inmune y en algunos parámetros productivos (peso y ganancia de peso). En las dietas que contenían las micotoxinas y PCL se obtuvieron resultados comparables al tratamiento Testigo, el cual no tenía micotoxinas. Las PCL (1,500 ppm) son una alternativa para dietas contaminadas con dosis bajas de AFB1 y OTA (350 µg/kg).

Palabras clave: paredes celulares de levaduras (PCL), *Saccharomyces cerevisiae*, micotoxinas, aflatoxina B1 (AFB1), ocratoxina A (OTA), respuesta inmune.

ABSTRACT

This experiment was conducted to evaluate the effects of yeast cell walls (YCW) of *Saccharomyces cerevisiae* on productive performance, humoral and cellular immune responses, histopathology and blood parameters in broiler chickens in counteracting the toxic effects of mycotoxins in naturally contaminated diet aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA) fed to commercial broilers. Two hundred and sixteen one day-old male broiler chicks were randomly assigned to eight treatments with three replicates of 9 chicks each one. Eight dietary treatments were: 1) Control, 2) Control + AFB1 (350 µg/kg), 3) Control + OTA (350 µg/kg), 4) Control + YCW (1,500 ppm), 5) Control + AFB1 (350 µg/kg) + OTA (350 µg/kg), 6) Control + AFB1 (350 µg/kg) + YCW (1,500 ppm), 7) Control + OTA (350 µg/kg) + YCW (1,500 ppm) and 8) Control + AFB1 (350 µg/kg) + OTA (350 µg/kg) + YCW (1,500 ppm). Broiler chickens were raised in a temperature controlled environment in two Petersime battery brooders, water and feed were provided *ad libitum*. All diets were based on sorghum + soybean. Birds and feed were weighted throughout the experiments to generate weight gain, feed intake and feed conversion ratio (FCR) data. These parameters were calculated at the end of the experiment (21 days of age). The effect of YCW in humoral immune response was evaluated after the application of Newcastle Disease Virus (NDV) vaccines. Simultaneous vaccinations were done at 8 days old. The serum samples were taken before the vaccination and 14 days post-vaccination. The antibody titers against NDV in serum were determined by hemagglutination inhibition (HI) test. To evaluate intestinal IgA, the intestinal content was collected to determinate IgA levels by ELISA test. To determinate cellular immune response a delayed basophilic hypersensitivity test was done in the experiment at 21 days of age. Response was measured to intradermal inoculation of phytohemagglutinin. Haematological indices were determined at 22 days old, the blood samples were preserved with anticoagulant, the counts were calculated indirectly based on cell counts and total counts. There was statistical difference ($P < 0.05$) in body weight and weight gain, these parameters were lower in treatments AFB, OTA and AFB+OTA. The inclusion of YCW helped to counteract the negative effect of mycotoxins, mainly when there was one mycotoxin in diet. Furthermore, there was statistical difference ($P < 0.05$) in local immune response (intestinal IgA concentration) and cellular immune response, which were higher in treatments with YCW. The addition of YCW in broiler chicken diets showed a positive effect in immune response and some productive parameters as body weight and weight gain. In diets with mycotoxins and YCW the results were similar to the Control treatment. The YCW (1,500 ppm) can be an alternative in diets contaminated with low doses of AFB1 and OTA (350 µg/kg).

Keywords: Yeast cell walls (YCW), *Saccharomyces cerevisiae*, mycotoxins, aflatoxin B1 (AFB1), ochratoxin A (OTA), immune response.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Situación actual de la avicultura	1
1.2 Micotoxinas	1
1.3 Aflatoxina B1 (AFB1)	4
1.4 Ocratoxina A (OTA)	8
1.5 Sinergismo entre AFB1 y OTA.....	11
1.6 Paredes celulares de levaduras (PCL)	12
1.7 Estructuras del sistema inmune en el sistema digestivo de las aves.....	15
1.8 Respuesta inmune	19
1.9 Justificación	21
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos particulares	23
4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1 Producción de micotoxinas en el laboratorio	24
4.2 Determinación de la concentración de micotoxinas	25
4.3 Diseño experimental y dietas	26
4.4 Parámetros productivos	27
4.5 Evaluación de la respuesta inmune humoral	27
4.6 Evaluación de la respuesta inmune celular.....	29
4.7 Toma de muestras de órganos para histopatología.....	30
4.8 Análisis estadístico	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSIÓN	37
7. CONCLUSIONES	48
8. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	49
9. REFERENCIAS	50
10. ANEXOS	64

LISTA DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1. Composición y análisis calculado de la dieta experimental de iniciación para pollo de engorda (1-21 días de edad).	64
Cuadro 2. Peso inicial, semanal y final de las aves durante las 3 semanas del estudio.	65
Cuadro 3. Ganancia diaria de peso por semana y final de las aves durante las 3 semanas del estudio.	66
Cuadro 4. Consumo de alimento semanal y final de las aves durante las 3 semanas del estudio.	67
Cuadro 5. Conversión alimenticia (CA) de las aves al final del estudio (3 semanas de edad).	68
Cuadro 6. Títulos de anticuerpos obtenidos contra la enfermedad de Newcastle (ENC) mediante la prueba de IH en aves de 8 y 22 días de edad.	69
Cuadro 7. Resultados obtenidos en el hemograma en aves de 3 semanas de edad.	70
Cuadro 8. Cantidad de IgA en contenido intestinal obtenida mediante la prueba de ELISA (ng/ml) en aves de 3 semanas de edad.	71
Cuadro 9. Peso relativo de los órganos (porcentaje de peso corporal) en aves de 3 semanas de edad.	72
Cuadro 10. Respuesta de hipersensibilidad tardía Incremento del grosor de la piel de la pata izquierda obtenido en aves de 3 días de edad.	73

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Fórmula química de los principales tipos de aflatoxinas.	5
Figura 2. Mecanismo de acción de AFB1.	8
Figura 3. Fórmula química de OTA.	9
Figura 4. Mecanismo de acción de OTA.	10
Figura 5. Mortalidad acumulada por tratamiento de las aves a los 21 días de edad.	74
Figura 6. Cortes histológicos de los tratamientos Testigo y PCL.	75
Figura 7. Cortes histológicos del tratamiento AFB.	76
Figura 8. Cortes histológicos del tratamiento OTA.	76
Figura 9. Cortes histológicos del tratamiento AFB+OTA.	77
Figura 10. Cortes histológicos del tratamiento AFB+OTA+PCL.	78

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación actual de la avicultura

La participación porcentual de la avicultura en el Producto Interno Bruto (PIB) total en el 2013 fue de 0.776% y en el PIB pecuario participó con el 40.9%. Dentro de las áreas que integran la producción pecuaria, la avicultura se posiciona en el primer lugar con el 63% a nivel nacional, siendo el huevo y el pollo los productos que participan con casi dos tercios de la producción pecuaria nacional con el 29% y 33.5%, respectivamente (UNA, 2014). Además, México ocupa a nivel mundial el quinto lugar en producción de pollo con 2'905,489 toneladas producidas en 2013 y se ubica en el mismo quinto lugar como productor de huevo con 2'522,428 toneladas producidas en el mismo año. El consumo per-cápita de pollo para 2013 fue de 24.8 kg y el de huevo fue de 21.9 kg, ocupando México el primer lugar a nivel mundial en el consumo per-cápita de huevo. Se estima que en el país 6 de cada 10 personas incluyen en su dieta productos avícolas como huevo, pollo y pavo (UNA, 2014).

1.2 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por varias especies de hongos que crecen en varios productos agrícolas (Cullen y Newberne, 1994). Son compuestos químicos de bajo peso molecular (generalmente 300 a 400 daltones) que se producen por el metabolismo secundario de cepas de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* y *Alternaria* (Steyn y Stander, 1999). De acuerdo a la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), aproximadamente el 25% de los granos en el mundo están contaminados con micotoxinas. A nivel mundial, se considera que son de cientos de millones de dólares las pérdidas económicas, debido a la presencia de micotoxinas en el alimento para las aves (CAST, 2003).

Los primeros casos conocidos y reportados por micotoxicosis se debieron a centeno contaminado con *Claviceps purpurea*, en la Edad Media. En 1912 Quevedo, describió la acción de los metabolitos tóxicos de un *Aspergillus* del maíz sobre varias especies animales en Argentina, lo que constituye la primera observación científica de las micotoxicosis en Sudamérica. En 1960, la intoxicación masiva de pavos en Inglaterra llevó al aislamiento de las aflatoxinas, llamadas así debido a que son producidas por especies del grupo *Aspergillus flavus* (Lillehoj, 1991).

Se reporta en la literatura que se han aislado e identificado cerca de 100,000 especies de hongos, de los cuales 400 pueden ser considerados potencialmente tóxicos, sin embargo, de estas 400 especies de hongos en la actualidad sólo se conocen el 5% (Árpád y Radomir, 1999).

Los hongos son vegetales carentes de clorofila, esto es un condicionante importante en la actividad biológica de estos. El hecho de carecer de clorofila provoca que ellos no son capaces de sintetizar materia orgánica utilizando la luz solar como fuente energética, por este motivo deben desarrollarse sobre un sustrato que contenga materia orgánica, la cual les proporcionará los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo. Este factor condiciona los lugares de crecimiento (Gimeno y Martins, 2006). Los hongos pueden invadir a los granos desde el campo o en el almacén provocando una disminución en la calidad de los alimentos de los animales que están contaminados, dentro de los cambios observados en los alimentos se mencionan: modificación de las características organolépticas del alimento, deterioro y reducción de las características nutritivas del alimento, segregación masiva de enzimas que provoca reacciones de lisis fuertemente exotérmicas, contaminación por micotoxinas y reducción de peso en el producto almacenado debido a que los hongos consumen los carbohidratos del grano para sobrevivir y reproducirse (Del Río, 2007).

De acuerdo al momento de desarrollo y contaminación de los productos agrícolas por los hongos, estos se han clasificado en tres grandes grupos (Christensen y Sauer, 1982; Moreno y Gutiérrez, 1992):

- a) Hongos de campo: son agentes causales de enfermedad de los cultivos, que invaden a los granos en el campo, dentro de este grupo se encuentran hongos del género *Fusarium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Acremonium* y *Cladosporidium*.
- b) Hongos de almacén: se desarrollan principalmente después de la cosecha y en condiciones de elevada humedad relativa, dentro de los principales géneros están *Aspergillus* y *Penicillium*.
- c) Hongos de deterioro: se encuentran en la naturaleza colonizando materia orgánica en proceso de descomposición y también necesitan una alta humedad para su desarrollo, aquí se encuentran *Absidia*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus*.

De la gran variedad de hongos que existen en la naturaleza, los principales géneros que producen micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*; que dependiendo del género pueden producir micotoxinas hepatotóxicas, nefrotóxicas, inmunosupresoras, cancerígenas y causantes de lesiones en tejidos de animales domésticos y seres humanos (D'Mello y MacDonald, 1997; Rustom, 1997).

La presencia de micotoxinas en los vegetales puede deberse:

- a la infección de la planta en el campo por el hongo.
- al crecimiento del hongo después de la cosecha sobre los frutos y granos almacenados.
- al desarrollo fúngico durante el almacenamiento de los materiales ya procesados (Swanson, 1987).

Para el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas existen tres factores fundamentales que son condicionantes:

- a) Físicos (humedad y actividad de agua (A_w), temperatura e integridad física de los granos).
- b) Químicos (pH, composición del sustrato y relación O_2/CO_2).
- c) Biológicos (presencia de invertebrados y estirpes específicas) (Gimeno y Martins, 2006).

No todos los hongos son capaces de producir micotoxinas y entre las especies que son capaces de producirlas, algunas producen un sólo tipo, mientras que otras son capaces de producir varias. Así como también, un tipo de micotoxina puede ser producida por diferentes especies de hongos (Boutrif y Bessy, 2001).

1.3 Aflatoxina B1 (AFB1)

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Fueron descubiertas en la década de 1960 en Inglaterra, luego de provocar un brote (enfermedad X del pavo) altamente letal en pavos. En dicho brote, miles de aves murieron después de consumir alimento que contenía pasta de cacahuete. El principal hongo aislado fue *A. flavus*, dándole el nombre a esta toxina (Sargeant *et al.*, 1963; Mallmann *et al.*, 2007).

La contaminación de los productos agrícolas con micotoxinas de *Aspergillus* se debe a la invasión del hongo saprobio oportunista sin capacidad patogénica, así las cepas de *A. flavus* suelen infectar antes de la cosecha a los granos (Lillehoj, 1992). La sensibilidad a los efectos tóxicos de las aflatoxinas varía considerablemente entre especies animales, inclusive entre individuos de una misma especie, la relación dosis-respuesta puede variar de acuerdo con raza, sexo, edad y composición de la dieta, entre otros factores. Para muchas especies, los machos son más susceptibles que las hembras, mientras que en general, la

sensibilidad es acentuadamente mayor en los jóvenes que en los adultos (Leeson *et al.*, 1995). Se ha demostrado la diferencia de susceptibilidad de pollos de engorda a las aflatoxinas según la edad de las aves, indicando que aves más jóvenes presentan mayores daños en su desarrollo en comparación con las aves de más edad (Mariani, 1998).

Se conocen 18 tipos de aflatoxinas: B1, B2, G1 y G2 son compuestos de ocurrencia natural, mientras que los metabolitos como M1, M2, P1, Q1 y Aflatoxicol (Ro), son resultado de la acción de microbios o del metabolismo del organismo sobre las cuatro principales micotoxinas (Smith y Ross, 1991). En 1963, se caracterizó la naturaleza química y física de las Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (Asao *et al.*, 1963; Van Dorp y Van der Zijden, 1963). Químicamente, las aflatoxinas son difurocumarolactonas (derivados de difuranocumarinas). Su estructura consiste de un anillo bifurano unido a un núcleo de cumarina y con un anillo pentona (en AFB y AFM) o a un anillo lactona (en AFG) (Buchi y Rae, 1969).

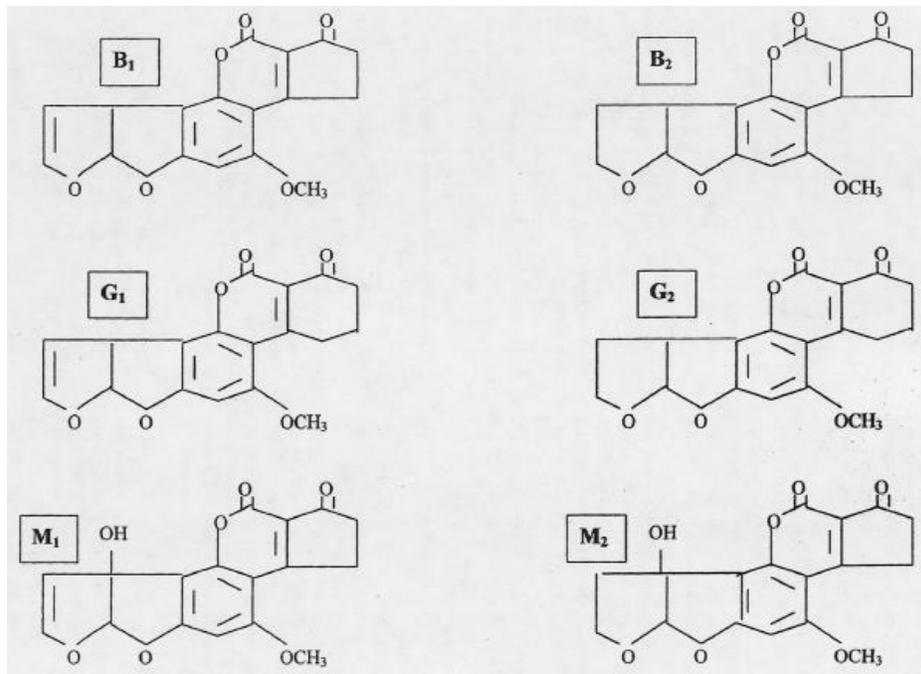


Figura 1. Fórmula química de los principales tipos de aflatoxinas
Fuente: Tomado de Mishra y Das (2003)

Aunque se han identificado aproximadamente 20 aflatoxinas, sólo 4 (B1, B2, G1 y G2) se presentan de forma natural. Las aflatoxinas M1 y M2 se aislaron de leche y orina de mamíferos y junto con P1, Q1 y el aflatoxicol (forma en que se almacenan las aflatoxinas en el organismo), se consideran como metabolitos secundarios en los animales (Smith y Ross, 1991).

Las aflatoxinas más tóxicas son la B1 (AFB1) y la M1 (siendo ésta el metabolito hidroxilado de la AFB1 y que proviene del metabolismo de algunos animales). Siguen después en orden de mayor a menor toxicidad, las aflatoxinas G1, M2, B2 y G2 (siendo la aflatoxina M2, un derivado metabólico de la aflatoxina B2) (Gimeno y Martins, 2006).

Las aflatoxinas B tienen un anillo ciclopentano en su estructura, el cual es reemplazado por una lactona en las aflatoxinas G. Las que pertenecen al grupo 1 tienen un doble enlace en el anillo furano terminal de la mitad bisfurano, ausente en las del grupo 2. Las aflatoxinas M tienen un grupo hidroxilo en el tercer carbono en la unión de los dos anillos furanos (Dutton, 1988). Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia (azul y verde) observada bajo luz UV mientras que los subíndices 1 y 2 se refieren a los patrones de separación de estos compuestos al utilizar el método de cromatografía de capa fina e indican un componente mayor y menor, respectivamente (Sargeant *et al.*, 1963; Detroy *et al.*, 1971).

Las pérdidas económicas asociadas a la exposición a aflatoxinas incluyen pobre crecimiento, aumento de la mortalidad, disminución de la producción de huevo y problemas en patas. La frecuente contaminación con aflatoxinas de los productos agrícolas y la exposición crónica de las aves a estas toxinas puede significar la diferencia entre ganancias y pérdidas en una empresa avícola. Entre las aves, los patos son los más susceptibles a las aflatoxinas, seguidos por los pavos, pollo de engorda, gallinas de postura comercial y las codornices (Devegowda *et al.*, 1998).

Las aflatoxinas tienen un efecto directo sobre la respuesta inmune humoral y celular. Bajos niveles de aflatoxina pueden afectar la inmunidad celular, mientras que la producción de inmunoglobulinas y la respuesta inmune por medio de anticuerpos se afecta por altos niveles de aflatoxina (Afzali y Devegowda, 1999). Las aflatoxinas como otras micotoxinas causan inmunosupresión, provocando que se presenten brotes de enfermedades y fallas vacunales con bajos títulos de anticuerpos (Raju y Devegowda, 2002).

La absorción, distribución y eliminación de AFB1 se da de forma rápida. Se acumula y metaboliza en el hígado y otros tejidos, su tiempo de vida media es de 36.5 minutos. La unión de metabolitos a macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos también ocurre poco después de la absorción. Algunos metabolitos unidos a ácidos nucleicos pueden persistir durante periodos relativamente largos de tiempo en los tejidos.

La AFB1 es absorbida en el tracto gastrointestinal debido a su alta liposolubilidad, es metabolizada y biotransformada en el hígado (principalmente) por enzimas de la superfamilia del citocromo P450 a aflatoxina P1 (AFP1), aflatoxina M1 (AFM1) y aflatoxina Q1 (AFQ1) y al metabolito AFB1 8,9 epóxido. En el hígado, las enzimas citocromo P450 son responsables de la activación de AFB1, AFM1 y AFP1, las cuales pueden formar aductos de ácidos nucleicos o pueden conjugarse a glutatión, conversión a dihidrodioles o unión a proteínas séricas u otras macromoléculas (IARC, 1993).

La cantidad de aductos de AFB1-ADN es mayor en el hígado que en cualquier otro órgano y el nivel de aductos generalmente está relacionado con la dosis de AFB1 y la susceptibilidad de la especie (Wang, 1999).

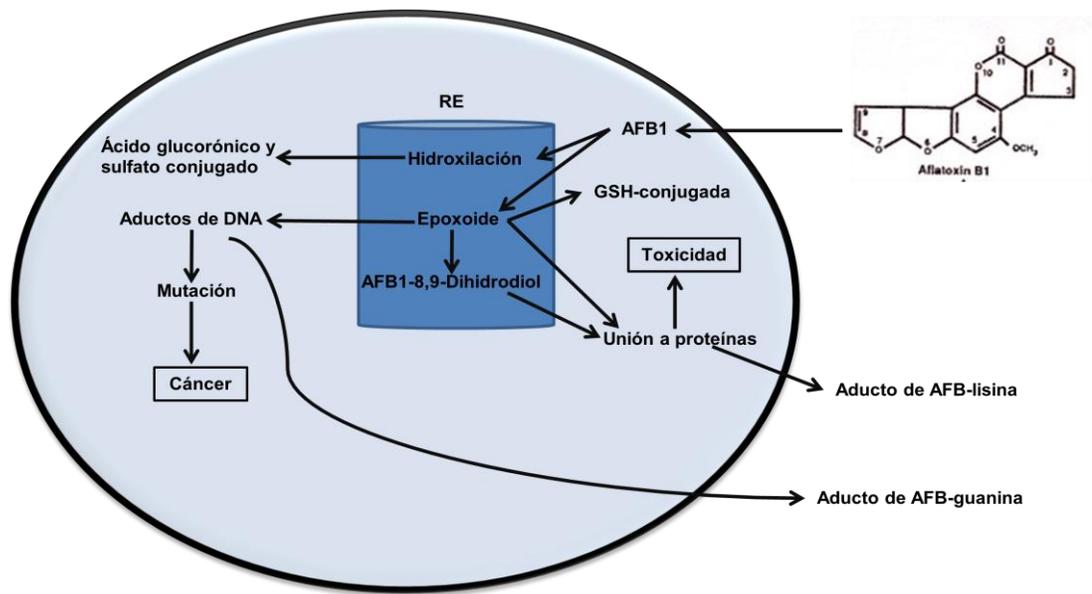


Figura 2. Mecanismo de acción de AFB1
Fuente: Adaptado de Riley y Pestka (2005)

1.4 Ocratoxina A (OTA)

Las ocratoxinas son producidas por dos géneros de hongos principalmente, *Aspergillus* y *Penicillium*. Químicamente, las ocratoxinas consisten de un núcleo dihidroisocumarina unido por un enlace amino a la L-fenilalanina (O'Brien y Dietrich, 2005). Se conocen tres tipos de ocratoxinas, denominadas A, B y C. Estructuralmente, estas tres micotoxinas difieren muy poco entre sí; la ocratoxina A (OTA) esta clorada y es la más tóxica, seguida por la ocratoxina B (OTB) (en donde se sustituye el cloro por un átomo de hidrógeno en el núcleo de isocumarina) que es mucho menos tóxica, y la ocratoxina C (OTC), que es el etil-ester de la OTA, con poca o nula toxicidad (Van der Merwe *et al.*, 1965; Li *et al.*, 1997). Las ocratoxinas α y β son productos de la hidrólisis de la OTA y OTB, respectivamente, y debido a la falta de la molécula de fenilalanina, no se consideran tóxicas. Se identificó por primera vez a las ocratoxinas en Sudáfrica en 1965, el nombre de la OTA se deriva de *Aspergillus ochraceus*, el primer hongo del cual fue aislada (Van der Merwe *et al.*, 1965).

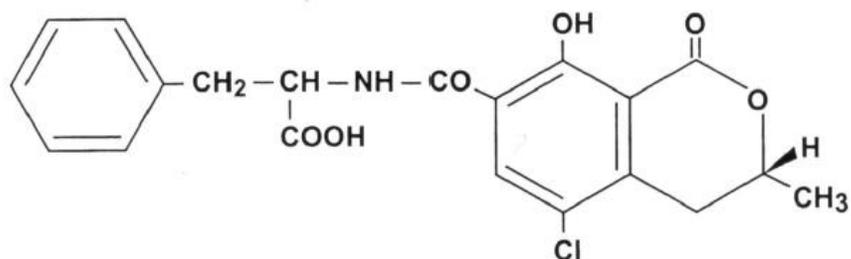


Figura 3. Fórmula química de OTA
Fuente: Tomado de Devegowda y Murthy (2005)

La contaminación por OTA en productos agrícolas se da principalmente por *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*, los cuales afectan a granos, cereales y alimento almacenado en diferentes regiones del mundo. En el género *Penicillium*, se ha considerado que *P. verrucosum* es la única especie capaz de sintetizar OTA (Pitt, 1987). Otros autores reportan que además de *P. verrucosum*, también *P. nordicum* puede producir OTA (Larsen *et al.*, 2001; Castella *et al.*, 2002; Cabañes *et al.*, 2010). En regiones con clima frío y templado, la OTA es principalmente producida por *P. verrucosum* o *P. nordicum*, el primero contamina principalmente cereales y sus productos, mientras que *P. nordicum* se ha detectado en productos cárnicos y queso (Larsen *et al.*, 2001; Cabañes *et al.*, 2010). En regiones con clima tropical y subtropical, OTA es principalmente producida por *A. ochraceus* (Devegowda *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 2005).

El órgano blanco de OTA es el riñón, en el cual las lesiones pueden presentarse por una exposición aguda o crónica (Harwig *et al.*, 1983). OTA es aproximadamente tres veces más tóxica que las aflatoxinas, para el pollo de engorda en edad temprana (Huff *et al.*, 1974). El mecanismo de acción de la OTA no es claro, pero su similitud estructural a la fenilalanina y el hecho de que inhibe muchas enzimas y procesos que son dependientes de este aminoácido, sugiere que actúa mediante la interrupción del metabolismo de la fenilalanina (CAST, 2003). Varios estudios han demostrado que la suplementación de L-fenilalanina o

de proteína, protege contra los efectos tóxicos de la OTA (JECFA, 2001; Marquardt y Frohlich, 1992).

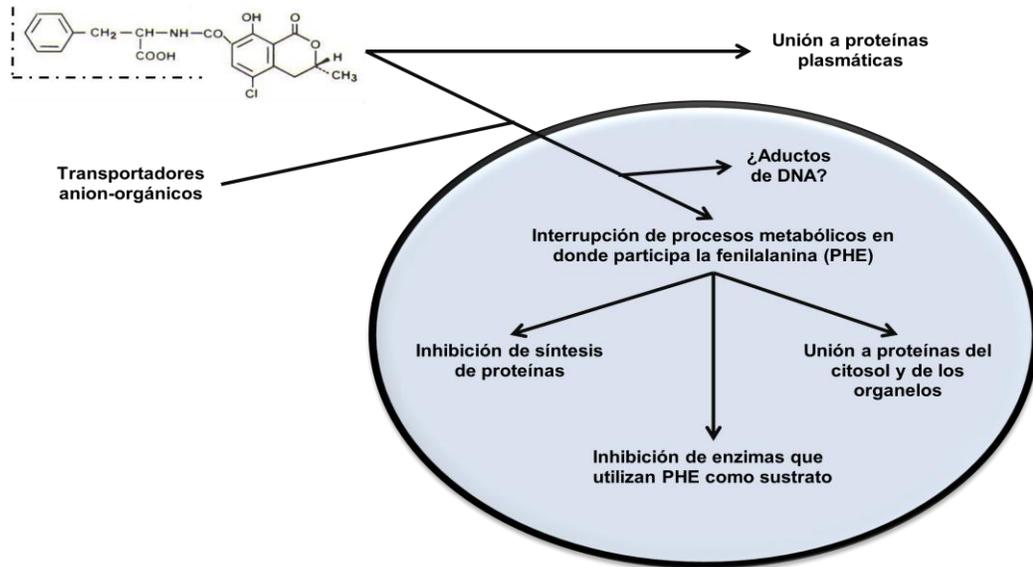


Figura 4. Mecanismo de acción de OTA
Fuente: Adaptado de Riley y Pestka (2005)

La absorción de la OTA se da de forma rápida en el tracto gastrointestinal y se une a proteínas del suero por su alta afinidad, lo que retarda su eliminación. Se considera que en la circulación sanguínea aproximadamente el 99% de la OTA está unida a proteínas, posteriormente se distribuye a tejidos y órganos, principalmente riñón, hígado, músculo y tejido adiposo, la filtración en riñón se da de forma limitada por su unión a proteínas y puede reabsorberse en túbulos proximales y distales lo que retarda su excreción, provocando toxicidad y daño renal. La excreción de la OTA es principalmente por orina y en menor grado en heces (Marquardt y Frohlich, 1992; CAST, 2003).

Se han reportado diversos efectos de OTA sobre el sistema inmune de las aves, produce reducción en el peso relativo de órganos linfoides como bazo, timo y bolsa de Fabricio, lo que provoca una disminución en el número de linfocitos, así

como en la cantidad de inmunoglobulinas en suero, lo que trae como consecuencia que las aves alimentadas con OTA tengan una menor respuesta inmune humoral y celular (Stoev *et al.*, 2000; Al-Anati y Petzinger, 2006; Elaroussi *et al.*, 2008).

1.5 Sinergismo entre AFB1 y OTA

La toxicidad individual de cada micotoxina puede ser aumentada o reducida, cuando se presentan dos o más micotoxinas como contaminantes del alimento (Huff y Doerr, 1981; Campbell *et al.*, 1983). La reacción de los animales afectados a la exposición de más de una micotoxina puede ser igual a la suma de los efectos esperados de cada micotoxina individualmente (efecto aditivo), menor a los efectos esperados de cada micotoxina individualmente (efecto antagonista), o mayor a los esperados por la suma individual de los efectos de cada micotoxina (efecto sinérgico) (Wyatt, 2005).

La probabilidad de que se presente una contaminación por varias micotoxinas en el alimento es alta. Varias especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* pueden producir más de una micotoxina simultáneamente. Si el grano se almacena bajo ciertas condiciones ambientales que son propicias para el crecimiento y producción de micotoxinas por una especie de hongo, estas mismas condiciones ambientales permiten el crecimiento y producción de micotoxinas por otras especies de hongos. Esto a su vez, conduciría a una contaminación del grano por varias micotoxinas. Además, algunos alimentos de los animales se preparan con ingredientes que provienen de diferentes zonas geográficas. Un ingrediente proveniente de una zona puede estar contaminado con una micotoxina, mientras que otro ingrediente proveniente de una zona diferente puede estar afectado por otro hongo y contaminado con otra micotoxina (Wyatt, 2005).

Los primeros estudios en donde se reportó que la AFB y OTA actúan de manera sinérgica, fueron realizados por Huff y Doerr (1981) y Huff *et al.*, (1984). En el campo, durante la cosecha y después de esta, los productos agrícolas pueden ser colonizados por diferentes especies de hongos y la producción de micotoxinas puede ser influenciada por la interacción entre los mismos hongos (D'Mello *et al.*, 1993).

En diversos estudios se ha reportado que cuando están presentes estas dos micotoxinas de manera conjunta en el alimento de las aves, provocan disminución en el peso (Campbell y Doerr, 1981; Huff *et al.*, 1992), de proteínas séricas, de albúmina y colesterol e incrementan el peso relativo de hígado, riñón y proventrículo. La toxicidad producida por la combinación de AFB y OTA es más severa que la de cada micotoxina por separado (Huff *et al.*, 1992). La combinación de ambas micotoxinas, provoca una mayor disminución en los parámetros productivos como es el crecimiento de las aves, consumo de alimento e índice de conversión, así como en la respuesta inmune humoral y celular, que cuando se administran de manera individual (Verma *et al.*, 2004).

1.6 Paredes celulares de levaduras (PCL)

El problema de las micotoxinas en las aves condujo al uso de arcillas y otros aluminosilicatos mezclados con el alimento para la absorción de las mismas en el tracto digestivo del animal, pero no son útiles para todas las toxinas y pueden afectar la nutrición, ya que eliminan algunos oligoelementos y vitaminas. Posteriormente se propició el uso de oligosacáridos (glucanos y mananos), extraídos de las paredes de SC para proteger a las aves de los efectos adversos de las micotoxinas (Huwig *et al.* 2001).

El mayor componente de las PCL son carbohidratos, que pertenecen al grupo de los oligosacáridos, que en su mayoría son de los grupos de los β -glucanos y manano-oligosacáridos (MOS). Se ha estimado que el porcentaje de polisacáridos

que puede contener la pared celular de la levadura es de 85 a 90% y un 10 a 15% de proteínas (Nguyen *et al.*, 1998). Los polisacáridos que constituyen las PCL corresponden a moléculas de 1,3- β -glucanos, 1,6- β -glucanos y quitina, y el resto de los componentes son mananoproteínas (Klis *et al.*, 2006).

En el área de la alimentación animal, en los últimos años se ha incrementado el interés por la utilización en la dieta de fracciones de PCL como fuentes de polisacáridos de tipo β -glucanos y MOS, que son reconocidos como aditivos naturales capaces de ejercer efectos benéficos en la salud y productividad de los animales (Hooge, 2004).

Hasta el momento no se ha determinado completamente el modo de acción de los β -D-glucanos. Yiannikouris y Moran (2008), concluyeron que el modo de acción se da por la interacción química que se presenta entre los β -D-glucanos y los grupos cíclico e hidroxilo de las micotoxinas, mediante enlaces débiles como lo son puentes de hidrógeno y uniones de van der Waals. Varios modelos proponen que las moléculas de las micotoxinas son atrapadas dentro de la hélice (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos y firmemente estabilizadas por las ramificaciones de cadenas laterales (1 \rightarrow 6)- β -D-glucano, debido a las altas similitudes geométricas entre las micotoxinas y el sitio activo de los β -D-glucanos. La plasticidad de la estructura de β -D-glucanos que exhiben una estereoquímica muy diversa, es la responsable de la afinidad con el gran rango de micotoxinas (Yiannikouris y Moran, 2008).

Las PCL se han postulado como un candidato frente a los antibióticos promotores del crecimiento (APC) (Weststrate *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2003), ya que los resultados observados en la productividad animal por la suplementación de MOS en la dieta, muestran ser similares a los obtenidos con los APC (Rosen, 2005). El mayor componente de las PCL son carbohidratos no digestibles por animales monogástricos, estos azúcares pertenecen al grupo de los oligosacáridos que estructuralmente están formados por unidades repetidas ya sea de un

monosacárido o disacárido a través de enlaces químicos (Jamroz, 2002; Swennen *et al.*, 2006).

Los MOS procedentes de las PCL de SC fueron introducidos como aditivos naturales en el alimento de las aves en 1993 por varias empresas productoras de aditivos (Hooge, 2004). En diversos estudios se ha sugerido que la estructura tridimensional de las PCL, constituida principalmente por polisacáridos, es capaz de llevar a cabo reacciones de adsorción para ciertas micotoxinas como son: aflatoxina, ocratoxina y zearalenona (Yiannikouris *et al.*, 2004; Jouany *et al.*, 2005; Ringot *et al.*, 2005).

Estudios con la administración de β -glucanos demuestran un efecto positivo y adyuvante en la respuesta inmune (Tsukada *et al.*, 2003; Harada *et al.*, 2006, Hida *et al.*; 2006; Zhonggeum *et al.*, 2005). Por otra parte, la suplementación de levaduras completas, fracciones de levaduras y mezclas con probióticos en dietas para pollos y pavos, han demostrado mejorar algunos parámetros productivos (Arce *et al.*, 2005, Chae *et al.*, 2006, Zou *et al.*, 2006, Solis *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2007). También tienen un efecto positivo en la integridad intestinal, exclusión de microorganismos patógenos y función inmunoestimulante (Guo *et al.*, 2003).

En el caso de las aves, se han reportado tres principales mecanismos de acción para los MOS o derivados de PCL adicionados a la dieta: exclusión de bacterias patógenas intestinales como *Salmonella* spp., mejoran la función intestinal o la salud intestinal al aumentar la uniformidad, integridad y altura de las vellosidades, y estimulan el sistema inmune (Spring *et al.*, 2000; Hooge, 2004).

Osborn y Khan (2000) reportaron que los MOS y glucanos son moléculas que tienen importantes funciones a nivel de sistema inmune y en intestino son importantes y benéficos para mantener la microflora intestinal y para incrementar

el crecimiento de las aves (Kocher *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en su inclusión son similares a los obtenidos con antibióticos promotores del crecimiento (Hooge, 2004). Además se ha reportado que la adición de PCL en la dieta de las aves aumenta el contenido de IgA secretora en duodeno, con lo cual, se produce una mayor protección de la mucosa y de las vellosidades intestinales, contra el daño producido por patógenos (Gao *et al.*, 2008).

En la alimentación de las aves, los resultados positivos encontrados en modelos *in vitro* para las PCL como adsorbente de micotoxinas, coinciden con los estudios *in vivo* en pollos de engorda, en los cuales las levaduras de SC y PCL fueron capaces de contrarrestar los efectos tóxicos del alimento contaminado con aflatoxinas y suministrado a las aves (Stanley *et al.*, 1993; Stanley *et al.*, 1995; Santin *et al.*, 2003a).

1.7 Estructuras del sistema inmune en el tracto digestivo de las aves

El sistema digestivo representa la vía de entrada de muchas sustancias y organismos, por lo que, tiene que evitar y controlar posibles infecciones, para esta función protectora se han identificado en el sistema digestivo estructuras anatómicas, en donde se encuentran gran cantidad de células del sistema inmune, por lo tanto, se consideran parte del sistema inmune digestivo en las aves comerciales, estas estructuras anatómicas son: divertículo de Meckel, placas de Peyer, tonsilas cecales, tejido linfoide asociado a intestino, bolsa de Fabricio (Schat *et al.*, 1991; Kajiwara *et al.*, 2003; Muir *et al.*, 2000) y tonsilas esofágicas (Olah *et al.*, 2003).

Tejido linfoide asociado a intestino

Debido a que la mucosa es un blanco primario para los antígenos, las aves tienen tejidos linfoides asociados a mucosa muy amplios. Estos incluyen a los tejidos linfoides asociados a intestino, aparato respiratorio y reproductor. A lo largo del tracto intestinal pequeñas acumulaciones linfoides, nódulos o folículos solitarios se

encuentran además de acúmulos de nódulos linfoides. Los linfocitos se entremezclan con macrófagos en la lámina propia, y los linfocitos que surgen de la vellosidad forman distintas áreas de células B y T. El tejido linfoide tiene una estructura bien organizada con un espacio interfolicular donde se acumulan células T, mientras que las células B integran los folículos y centros germinales (Olah y Vervelde, 2008).

Divertículo de Meckel (DM)

Es un remanente de la yema, se observa como un apéndice del intestino delgado y se localiza a la mitad del yeyuno. Después de la incubación, grandes cantidades de yema pasan hacia al intestino, siendo una fuente de alimento para el pollito. Al momento de la incubación, no hay tejido linfoide en el DM, sin embargo, durante la regresión del saco vitelino en las primeras dos semanas posteriores a la incubación aparece tejido mielopoyético en la parte distal del divertículo y hay tejido linfopoyético en la parte más proximal al intestino (Olah y Glick, 1984).

A lo largo de todo el DM hay células plasmáticas IgA e IgY y se pueden distinguir áreas de células B y T (Jeurissen *et al.*, 1988). Anatómicamente, el DM es muy parecido a las tonsilas cecales y a las placas de Peyer, sin embargo, el desarrollo de centros germinales se presenta a una mayor edad en el DM, lo cual puede deberse a una menor exposición a antígenos presentes en el intestino (Glick, 1978; Olah *et al.*, 1984).

Placas de Peyer (PP)

Hasta seis PP pueden ser detectadas a lo largo de todo el intestino, con la excepción de una que se encuentra anterior a la unión ileocecal (Befus *et al.*, 1980). La zona subepitelial es dependiente de células B. La zona interfolicular es dependiente de células T y las células expresan en la mayoría células CD4⁺ (Bucy *et al.*, 1988). Principalmente células plasmáticas IgY y en menor cantidad IgA e IgM, son encontradas en los centros germinales y en las áreas interfoliculares. El

borde luminal del epitelio es positivo para IgA e IgY, pero no para IgM (Burns, 1982).

Tonsilas cecales (TC)

Las TC están localizadas en el extremo proximal de cada saco cecal. Aparecen alrededor del día 10 durante el desarrollo embrionario y los linfocitos están presentes antes del día 18 (Payne, 1971). Durante la primera semana después de la eclosión aumenta el número de linfocitos, en la segunda semana aparecen los centros germinales y su número aumenta con la edad (Hedge *et al.*, 1982). En la zona subepitelial se pueden encontrar células IgM e IgY y algunas células T CD4⁺ y CD8⁺. En el área interfolicular hay linfocitos T, principalmente CD4⁺ (Bucy *et al.*, 1988; Jeurissen y Janse, 1998).

Tonsilas esofágicas (TE)

La existencia de tejido linfoide en la unión del esófago con el proventrículo, fue descrita por primera vez por Hodges en 1974. Pero fue hasta el año 2003 cuando se describió de forma detallada (Olah *et al.*, 2003).

Las TE son estructuras linfoides localizadas en la unión entre el esófago y el proventrículo. El esófago forma de 6 a 8 pliegues longitudinales, en donde hay tejido linfoide localizado en la parte distal de estos pliegues, el cual forma las tonsilas. El número de tonsilas es similar al número de pliegues (Olah *et al.*, 2003; Nagy *et al.*, 2005).

Células B forman los centros germinales y hay áreas interfoliculares de células T localizadas entre los centros germinales y el epitelio. Es el único tejido linfoide localizado en la parte superior del tracto digestivo, por lo que, está expuesto a antígenos ambientales sin digerir (Olah *et al.*, 2003; Nagy *et al.*, 2005).

Además de estas estructuras anatómicas que se encuentran en el tracto digestivo, los principales órganos linfoides en las aves son el timo y la BF, y son el sitio en donde se da el desarrollo de los linfocitos T y B, respectivamente.

Bolsa de Fabricio (BF)

La BF tiene la forma y el tamaño de una castaña. Está localizada entre la cloaca y el sacro. Alcanza su máximo tamaño a las 8-10 semanas de edad, después involuciona al igual que el timo. A los 6-7 meses de edad, la mayor parte de la BF esta involucionada. Está rodeada por una gruesa capa de tejido muscular liso. Dentro del lumen de la bolsa hay 15-20 pliegues que están llenos de folículos, los cuales son aplanados, de forma oval, de 0.2-0.4 mm de diámetro. El conteo de número de folículos está estimado en 20,000 en la bolsa. La involución natural de la BF comienza alrededor de las 12 semanas de edad, precediendo a la maduración sexual. Al menos el 98% de los linfocitos de la BF son células B. Las células T están dispersas en la corteza, pero pocas entran a la médula. Las células B proliferan en corteza y médula (Olah y Vervelde, 2008).

Timo

Los timos de las aves se encuentran paralelos al nervio vago y a las venas yugulares internas (Hodges, 1974). A cada lado del cuello hay 7-8 lóbulos separados, que se extienden de la tercer vértebra cervical a los segmentos torácicos superiores (Kendall, 1980). Cada lóbulo esta encapsulado con tejido conectivo fino fibroso y está dentro de tejido adiposo. Los lóbulos del timo tienen forma de frijol y alcanzan un tamaño máximo de 6-12 mm de diámetro a los 3-4 meses de edad, antes de que la involución fisiológica comience (Olah y Vervelde, 2008). La corteza del timo está repleta de timocitos y los linfocitos están situados bajo la superficie de las células epiteliales. La médula del timo tiene un gran número de células epiteliales y un pequeño número de timocitos. La estructura histológica clásica en la médula del timo es el Corpúsculo de Hassall, una

acumulación epitelial celular. En aves son pequeños, con estructuras pobremente desarrolladas (Olah y Vervelde, 2008).

1.8 Respuesta inmune

Para ser eficiente en esta función protectora, el organismo se sustenta en mecanismos de defensa, los cuales se clasifican en: 1) mecanismos de defensa inespecíficos o inmunidad innata y 2) mecanismos de defensa específicos o inmunidad adquirida (Abbas *et al.*, 1997).

1) Mecanismos de defensa inespecíficos o inmunidad innata.

Es la primera línea de defensa natural contra los antígenos, la característica más notable en estas respuestas es la falta de especificidad. Los mecanismos pueden ser: a) físicos o estructurales como lo son el epitelio y la mucosa intestinal, con su integridad evitan la entrada y el establecimiento de los antígenos, las vellosidades intestinales, los movimientos peristálticos y la producción de moco poseen la capacidad de captar y desplazar partículas extrañas hacia el exterior; b) químicos, como el pH ácido o alcalino que se encuentra a lo largo del tracto digestivo y las enzimas; y c) proceso de inflamación, que se caracteriza por un aumento en la permeabilidad capilar del área afectada, lo que trae como consecuencia la migración de heterófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos y células dendríticas, las cuales realizan el proceso de fagocitosis. Debido a este aumento en la permeabilidad se hace posible el paso del complemento, de anticuerpos y otras moléculas presentes en el plasma (Abbas *et al.*, 1997; Tlaskalová *et al.*, 2011).

2) Mecanismos de defensa específicos o inmunidad adquirida.

Se desarrolla cuando el organismo del ave está expuesto a un antígeno y genera una respuesta inmune que es específica para dicho antígeno, además de generar memoria inmunológica. Estos mecanismos se dividen en respuesta inmune humoral y respuesta inmune celular (Gómez *et al.*, 2010).

Respuesta inmune humoral

Se da por la producción de inmunoglobulinas o anticuerpos que producen las células plasmáticas derivadas de la estimulación de los linfocitos B. Está dirigida contra antígenos con localización extracelular. En aves comerciales se han descrito tres isotipos de inmunoglobulinas: IgY, IgM e IgA, siendo esta última la única detectada en el tracto digestivo, así como en otras superficies mucosas (Gómez *et al.*, 2010).

Respuesta inmune celular

Se presenta cuando los linfocitos T reconocen y responden de manera específica contra un antígeno extraño. Los linfocitos T se dividen en CD4 (colaboradores o inductores) y CD8 (citotóxicos), para que estos linfocitos puedan realizar sus mecanismos efectoros es necesario que las células presentadoras de antígenos (CPA) procesen y presenten a los antígenos en el contexto de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH). Los antígenos sufren un proceso de degradación y presentación a través de moléculas clase I y clase II del CPH. Los linfocitos CD4 reconocen péptidos presentados en el contexto de moléculas clase II del CPH y su función efectora es la producción de citocinas. Los linfocitos CD8 reconocen péptidos presentados bajo el contexto del CPH clase I siendo su función efectora la citotoxicidad. Todas las células nucleadas expresan en su superficie moléculas clase I del CPH y las CPA (células dendríticas, linfocitos B, macrófagos, células endoteliales) expresan moléculas clase II del CPH. Se ha reportado la presencia de una molécula clase IV del CPH en aves, la cual confiere una función co-estimuladora en la respuesta de anticuerpos (Telemo *et al.*, 2003).

1.9 JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los granos utilizados en la alimentación animal están contaminados con micotoxinas, que al combinarse pueden tener un efecto sinérgico, esto sucede cuando AFB1 y OTA están presentes en el mismo alimento, lo que provoca un mayor efecto sobre la salud de las aves. En este estudio se utilizaron dosis bajas de AFB1 y OTA (350 µg/kg), debido a que son este tipo de dosis las que se presentan con mayor frecuencia en los granos contaminados, pasando desapercibidos muchas veces los efectos de las micotoxinas, afectando el sistema inmune y los parámetros productivos en las aves. Este estudio se realizó para determinar el efecto de AFB1 y OTA sobre la respuesta inmune y los parámetros productivos y demostrar si las PCL contrarrestan los efectos de las micotoxinas cuando se presentan solas o en combinación y si además pueden ayudar a mejorar la respuesta inmune y los parámetros productivos de las aves.

2. HIPÓTESIS

El uso de PCL en dietas de pollo de engorda contaminadas con dosis bajas de AFB1 y OTA (solas o en combinación) produce un efecto positivo en los parámetros productivos y en la respuesta inmune, tanto humoral como celular, de las aves.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la suplementación de PCL en una dieta contaminada con dosis bajas de micotoxinas (AFB y OTA) sobre los parámetros productivos y la respuesta inmune humoral y celular en aves de 21 días.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar los parámetros productivos (peso, consumo de alimento, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia) de las aves alimentadas con dietas contaminadas con AFB1 y OTA (solas o en combinación) y determinar si las micotoxinas tienen efecto sobre los parámetros productivos.
2. Evaluar el efecto de las PCL sobre los parámetros productivos de las aves alimentadas con dietas contaminadas con dosis bajas de micotoxinas, para determinar si las PCL tienen un efecto sobre las mismas, como una alternativa para disminuir su efecto tóxico.
3. Evaluar el efecto de AFB1 y OTA adicionadas en dosis bajas en dietas de pollo de engorda, sobre la respuesta inmune humoral y celular de las aves.
4. Analizar el efecto de la inclusión de las PCL sobre la respuesta inmune humoral y celular de las aves alimentadas con dietas contaminadas con una o dos micotoxinas (AFB1 y OTA), y determinar si las PCL tienen un efecto inmunoestimulante sobre la respuesta inmune.
5. Evaluar el efecto en peso y daño a nivel histológico de hígado, riñón, bazo, timo y BF, de aves alimentadas con dietas contaminadas con AFB1 y OTA.
6. Evaluar si las PCL tienen un efecto en el peso y a nivel estructural (cortes histológicos) de hígado, riñón, bazo, timo y BF, de aves alimentadas con dietas contaminadas con AFB1 y OTA.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se dividió en tres etapas:

- Producción de micotoxinas en el laboratorio.
- Preparación de las dietas, realización del experimento de campo y toma de muestras para análisis de laboratorio.
- Procesamiento y análisis de las muestras en el laboratorio.

4.1 Producción de micotoxinas en el laboratorio

Las micotoxinas se produjeron en la unidad de investigación de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Cuautitlán, en donde se inoculó e infectó el maíz con el hongo *A. flavus* para producir la AFB1. Los hongos se cultivaron en cajas de Petri con medio agar dextrosa papa por 7 días a 27°C, una vez que se observó el crecimiento de los hongos, las cajas se almacenaron en refrigeración a 4°C para detener el crecimiento y para contaminar el grano posteriormente.

La cepa de *A. flavus* se colocó en una solución de agua estéril con 1% de Tween 80, para obtener una suspensión de esporas, posteriormente se tomó una muestra que se colocó en una cámara de Neubauer, la cual se observó al microscopio para realizar el conteo de esporas y calcular su concentración.

Una vez que se estimó la cantidad de esporas de *A. flavus* contenidas por ml de la suspensión, se inocularon 20 kg de maíz, el cual fue previamente esterilizado, se agitó el frasco que lo contenía, para que el inóculo quedara de manera uniforme en todo el maíz y se mantuvo en incubación por 28 días a 27°C, con una humedad de 18%, durante este periodo se observó el crecimiento del hongo en el maíz semanalmente. Posteriormente el maíz se esterilizó para eliminar el hongo y las esporas, con el fin de que solo se mantuvieran las aflatoxinas, el maíz se colocó en una estufa para deshidratarlo y se molió para después continuar con la determinación de aflatoxinas. La OTA fue donada por un laboratorio comercial

ubicado en Tehuacán, Puebla; debido a que no se pudo obtener la suficiente cantidad en el laboratorio para la realización del experimento.

4.2 Determinación de la concentración de micotoxinas

Se realizó la determinación de la concentración de micotoxinas en cada uno de los concentrados, esta se llevó a cabo en la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la FES Cuautitlán.

La técnica usada para realizar la medición de micotoxinas fue mediante cromatografía con columnas de inmunoafinidad, en ambos casos. Para determinar AFB1 se utilizó el método de AflaTest B de Vicam Corp (1999) y para el caso de la OTA se usó OchraTest, también de Vicam Corp (1999). Los métodos se describen en el apartado de Anexos.

La lectura final del filtrado obtenido de las columnas de inmunoafinidad se realizó con un fluorómetro, obteniendo la concentración final de cada una de las micotoxinas en los concentrados de maíz contaminado, para así poder calcular la cantidad necesaria de cada una de las micotoxinas en el alimento y obtener la concentración programada para el experimento. Una vez que se tuvieron las concentraciones finales de las micotoxinas, se realizó la preparación de las dietas las cuales fueron a base de sorgo-soya. El sorgo se analizó previamente mediante la misma técnica de cromatografía con columnas de inmunoafinidad para comprobar que no hubiera alguna contaminación adicional.

Al momento del mezclado de los ingredientes de la dieta, se adicionaron la AFB1 y OTA con el fin de que se distribuyeran homogéneamente por todo el alimento y para que las aves consumieran la misma cantidad. Una vez preparado el alimento de cada tratamiento para el experimento, se volvió a analizar en el laboratorio mediante la misma técnica de cromatografía con columnas de afinidad, para comprobar que tuviera la cantidad planeada de cada una de las micotoxinas en

sus respectivos tratamientos o que no estuvieran presentes en el caso de los tratamientos Testigo y PCL. La concentración final que se obtuvo en el alimento de cada una de las micotoxinas fue de 350 µg/kg.

4.3 Diseño experimental y dietas

Para la realización del proyecto de investigación se utilizaron ocho tratamientos, los cuales se asignaron de la siguiente manera:

- 1) **Testigo:** dieta normal.
- 2) **AFB:** Testigo + 350 µg/kg de AFB1.
- 3) **OTA:** Testigo + 350 µg/kg de OTA.
- 4) **PCL:** Testigo + 1,500 ppm de PCL (Safmannan, Safmex México)
- 5) **AFB+OTA:** Testigo + 350 µg/kg de AFB1 + 350 µg/kg de OTA.
- 6) **AFB+PCL:** Testigo + 350 µg/kg de AFB1 + 1,500 ppm de PCL.
- 7) **OTA+PCL:** Testigo + 350 µg/kg de OTA + 1,500 ppm de PCL.
- 8) **AFB+OTA+PCL:** Testigo + 350 µg/kg de AFB1 + 350 µg/kg de OTA + 1,500 ppm de PCL.

La investigación se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, el cual se localiza en Salvador Díaz Mirón 89, Colonia Santiago Zapotitlán, Delegación Tláhuac, en el Distrito Federal, se ubica a una altura de 2250 msnm, entre los paralelos 19°15' latitud oeste. Con condiciones de clima templado húmedo (Cw), siendo enero el mes más frío y mayo el más caluroso, con una temperatura media anual de 16°C y una precipitación pluvial anual media de 747 mm (INEGI, 1992).

El experimento se realizó con 216 pollos de engorda de sexo macho, estirpe Ross, de 1 día edad, que se obtuvieron de una incubadora comercial. Los pollos se pesaron individualmente y se distribuyeron de manera homogénea en los 8

tratamientos, con la finalidad de iniciar el trabajo experimental sin ninguna tendencia o diferencia estadística entre los pesos de las aves. Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones de 9 pollos cada una. Las aves se alojaron durante toda la prueba en jaulas o unidades de crianza Petersime, bajo condiciones de ambiente controlado. El agua y el alimento se administraron a libre acceso.

Se formuló una dieta de inicio para pollo de engorda (1-21 días), la cual se calculó con el paquete computacional Nutrion[®]. La dieta base fue de sorgo-soya, la cual se muestra en el cuadro 1. A la dieta Testigo se le adicionó el maíz contaminado con cada una de las micotoxinas (AFB y OTA) y las PCL, de acuerdo a como se describió para cada tratamiento.

4.4 Parámetros productivos

Durante el experimento, las aves y el alimento se pesaron semanalmente, para obtener la ganancia de peso, el consumo de alimento e índice de conversión alimenticia, también se revisó diariamente la presencia de mortalidad. Los datos informados de los parámetros productivos son de 0 a 21 días. Además, se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante para serología y con EDTA para hemograma; las aves se sacrificaron a los 22 días de edad, por dislocación cervical para tomar muestras de órganos como bazo, timo, BF, hígado y riñón; y de lavados intestinales.

4.5 Evaluación de la respuesta inmune humoral

Para verificar el efecto inmunoestimulante de las PCL a nivel sistémico, se realizó una vacunación simultánea, con virus vivo por vía ocular y vacuna emulsionada por vía subcutánea, con el virus de la enfermedad de Newcastle (ENC) a los 8 días de edad. Se tomaron muestras de sangre antes de la vacunación y a los 14 días post-vacunación (22 días de edad), se colectaron 5 muestras por réplica y los sueros se congelaron a una temperatura de -20°C, para posteriormente determinar

títulos de anticuerpos séricos específicos para el virus de Newcastle a través de la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación (IH).

Determinación de niveles de IgA en contenido intestinal

Se tomaron 10 cm de duodeno (de 3 aves por réplica) y se realizaron lavados con 10 ml de solución PBS (phosphate buffered saline, por sus siglas en inglés) estéril, pasando tres veces el PBS en la fracción de tubo intestinal, posteriormente se recolectó el contenido y se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se congeló a una temperatura de -20°C , para su posterior determinación de los niveles de IgA, mediante la prueba de ELISA.

Las concentraciones de IgA en lavados intestinales se evaluaron mediante el uso del sistema comercial Chicken IgA ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery TX). Las placas de 96 pozos de fondo plano, fueron cubiertas con Anti-IgA de pollo, previamente reconstituida en una solución buffer de carbonatos (0.05M, pH 9.6) y se dejaron incubar por 24 horas a 4°C . Posteriormente, se lavaron las placas tres veces con PBS adicionado con Tween-20 al 0.05%. Se añadió a los pozos una solución de bloqueo de PBS-leche descremada al 0.5% y sacarosa al 0.2%, se incubaron por 30 minutos y se lavaron tres veces con la solución de PBS con Tween-20 al 0.05%. Se depositaron las muestras de lavado intestinal en cada uno de los pozos con la dilución a probar, junto con los controles y se incubaron 1 hora a 37°C . Posteriormente se retiraron las muestras y las placas se lavaron cinco veces con PBS Tween-20 al 0.05%. Se añadió el conjugado HRP (goat anti-chicken IgA-HRP, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery TX) y se volvieron a incubar las cajas por 1 hora a 37°C , se realizó el lavado cinco veces con la solución PBS Tween-20 al 0.05%. Después se añadió el sustrato ABTS (Synbiotic Corporation) (2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]), dejándose incubar por 20 minutos y la reacción se detuvo con una solución de "stop" (H_2SO_4 2M). Por último, se realizó la lectura de la absorbancia

empleando el lector de ELISA (Lector ELISA Biotek® EL X800), con una longitud de onda de 405nm.

4.6 Evaluación de la respuesta inmune celular

Hemograma

Para determinar si hubo algún efecto de las PCL y de las micotoxinas sobre la respuesta inmune celular, se colectaron muestras de sangre a los 22 días de edad, se tomaron 3 muestras por réplica y se conservaron en tubos con anticoagulante EDTA, para la realización del conteo de leucocitos totales y por línea celular, hematocrito, eritrocitos, proteínas plasmáticas y trombocitos mediante la prueba de laboratorio de hemograma. Las muestras se procesaron en el laboratorio y el conteo de células se realizó utilizando una cámara de Neubauer, la cual se observó al microscopio.

Prueba de hipersensibilidad tardía

La evaluación se realizó mediante una prueba de hipersensibilidad tardía (Edelman *et al.*, 1985; Corrier y DeLoach, 1990) a los 21 días de edad de las aves, como respuesta a la inoculación intradérmica con fitohemaglutinina a una concentración de 0.1 mg/0.1 ml en la membrana interdigital de las falanges 3 y 4 de la extremidad inferior izquierda, se emplearon 3 pollos por réplica. En la membrana interdigital de la pata derecha se realizó el mismo procedimiento utilizando solución salina estéril (0.1 ml) como control. A las 24 horas post-inoculación (22 días de edad) se realizó la lectura. Se determinó el grosor de la membrana interdigital con un vernier digital antes de la inoculación y 24 horas después. El cálculo del incremento en el grosor de la membrana interdigital de las aves se realizó con la siguiente fórmula: respuesta a la hipersensibilidad cutánea = grosor membrana interdigital pata izquierda post-inoculación (24 horas) – grosor membrana interdigital pata izquierda pre-inoculación (Corrier y DeLoach, 1990).

4.7 Toma de muestras de órganos para histopatología

Se tomaron muestras de 3 aves por réplica, de los siguientes órganos: bazo, timo, BF, hígado y riñón, los cuales se pesaron, se conservaron y se fijaron en formalina al 10%, posteriormente se procesaron y se realizaron los cortes histológicos de cada órgano, para realizar su observación y análisis histopatológico.

4.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de cada variable en el estudio, se realizó mediante un diseño completamente al azar (análisis de varianza), la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey. Los datos se corrieron y analizaron con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 20. Los títulos de anticuerpos obtenidos en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, se transformaron a logaritmo base 2.

El modelo estadístico está representado mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{ij} = \mu_i + T_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = la j-ésima observación del i-ésimo grupo de tratamientos, la variable respuesta.

μ = es la media de la i-ésima población en tratamiento.

T_j = efecto del grupo.

ϵ_{ij} = es el error experimental.

5. RESULTADOS

Peso de las aves

Las aves se pesaron al día 1, 7, 14 y 21 de edad. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 2. En los pesos promedio de las aves al día 1 y 7 de edad, no se presentó ninguna diferencia estadística significativa ($P>0.05$) entre los tratamientos. A los 14 días de edad, se observó diferencia estadística ($P<0.05$) entre los tratamientos, el peso promedio de las aves del grupo AFB+OTA (405.33 g) tuvo una disminución en el peso, con respecto a los demás tratamientos. A los 21 días de edad, se presentó diferencia estadística significativa ($P<0.05$) entre los diferentes tratamientos. El peso de las aves de los grupos AFB (799.84 g), OTA (804.72 g) y AFB+OTA (795.30 g) fue menor al de los demás tratamientos. Se observó que el peso promedio de las aves de los grupos Testigo (814.52 g), PCL (844.48 g), AFB+PCL (845.17 g), OTA+PCL (834.08 g) y AFB+OTA+PCL (813.17 g) fueron similares. Se presentó un efecto positivo en el peso por la inclusión de las PCL, cuando estaban junto con AFB (AFB+PCL) en el alimento ($P<0.05$).

Ganancia diaria de peso (GDP)

Los resultados para GDP se muestran en el Cuadro 3. En la semana 1, no existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($P>0.05$). En la semana 2, se presentó diferencia estadística ($P<0.05$) del tratamiento AFB+OTA (34.67 g), con los demás tratamientos. En la semana 3, no existió diferencia entre los tratamientos ($P>0.05$). Se observaron diferencias significativas en la GDP final ($P<0.05$), los tratamientos PCL (38.06 g) y AFB+PCL (38.09 g) tuvieron la mejor GDP, en comparación con AFB (35.90 g), OTA (36.14 g) y AFB+OTA (35.69 g), comprobándose el efecto negativo de las micotoxinas sobre este parámetro, como se esperaba.

Consumo de alimento

El consumo de alimento por semana y final se presenta en el Cuadro 4. En las semanas 1 y 2 no se observan diferencias estadísticas significativas en el consumo de alimento entre los tratamientos ($P>0.05$). En la semana 3, si se presentó diferencia estadística ($P<0.05$) entre los tratamientos, el consumo del grupo AFB+OTA (536.16 g) fue menor en comparación con los demás tratamientos. En el consumo total acumulado también existió diferencia estadística entre tratamientos ($P<0.05$), el mayor consumo de alimento se obtuvo en los tratamientos AFB+PCL (1044.37 g) y OTA+PCL (1042.30 g), siendo diferentes al consumo del tratamiento AFB+OTA (992.91 g), que fue el tratamiento con el menor consumo de alimento. También en los grupos AFB (1019.27 g) y OTA (1006.43 g), se presentó una disminución en el consumo de alimento final.

Conversión alimenticia (CA)

La CA se calculó al final del experimento, los resultados se muestran en el Cuadro 5. En este parámetro no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P>0.05$), debido a que fue muy similar en todos los grupos.

Mortalidad

La mortalidad por tratamiento se muestra en la figura 5. Se tuvieron en total 8 aves muertas en el estudio, se registraron 2 aves muertas por cada tratamiento en AFB+OTA y AFB+OTA+PCL, un ave muerta por cada grupo en Testigo, OTA, PCL y AFB+PCL, y no se presentó mortalidad en los tratamientos AFB y OTA+PCL. A todas las aves se les realizó la necropsia y en ninguna se observaron lesiones características de daño por micotoxinas. Se comprobó que la mortalidad se presentó por eventos adversos (vacunación, aplastamiento, pollitos de segunda calidad), por lo que, no se consideró la mortalidad en el análisis de resultados de este estudio.

Prueba de Inhibición de la hemoaglutinación (IH)

Los resultados obtenidos de los sueros colectados mediante la prueba de IH se muestran en el Cuadro 6. No se presentó diferencia estadística significativa entre los diferentes tratamientos ($P > 0.05$), antes de la vacunación (8 días de edad) y a los 14 días post-vacunación (23 días de edad). Sin embargo, se observaron valores numéricos más altos de títulos de anticuerpos en los tratamientos PCL, AFB+PCL, AFB+OTA+PCL, con títulos contra ENC de 9.38, así como en OTA+PCL con un título de 9.50, coincidiendo estos cuatro tratamientos que son en los cuales se adicionaron las PCL a la dieta de las aves. Los títulos más bajos se presentaron en los grupos AFB+OTA (8.50), AFB (8.38) y OTA (8.00), en donde estaban presentes las micotoxinas.

Hemograma

Los resultados del hemograma se muestran en el Cuadro 7. Se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en el número de leucocitos, heterófilos y linfocitos entre los diferentes tratamientos. En leucocitos totales, los tratamientos AFB ($7.21 \times 10^9/L$), OTA ($6.82 \times 10^9/L$), AFB+OTA ($6.75 \times 10^9/L$) y AFB+OTA+PCL ($7.28 \times 10^9/L$), tuvieron el menor número de leucocitos con respecto a los demás tratamientos ($P < 0.05$). En los tratamientos PCL ($8.57 \times 10^9/L$), AFB+PCL ($8.26 \times 10^9/L$) y OTA+PCL ($8.17 \times 10^9/L$), se presentó el mayor número de leucocitos. Además se observó que las PCL ayudaron a contrarrestar los efectos tóxicos de las micotoxinas en la respuesta inmune celular, siendo mejor este efecto cuando había una micotoxina presente en el alimento.

En el número de heterófilos, los grupos OTA ($2.60 \times 10^9/L$) y OTA+PCL ($3.65 \times 10^9/L$), tuvieron una disminución en el número de heterófilos en comparación con los demás tratamientos ($P < 0.05$). Los mejores resultados en este parámetro se obtuvieron en los grupos AFB+PCL ($3.67 \times 10^9/L$), OTA+PCL ($3.65 \times 10^9/L$) y PCL ($3.64 \times 10^9/L$), coincidiendo los tres en donde estaban presentes las PCL solas o en combinación con una micotoxina.

El número de linfocitos fue menor en los grupos AFB ($3.07 \times 10^9/L$), OTA ($3.06 \times 10^9/L$), AFB+OTA ($3.05 \times 10^9/L$) y AFB+OTA+PCL ($3.08 \times 10^9/L$) con respecto a los demás tratamientos donde estaban las PCL ($P < 0.05$). El número mayor de linfocitos se obtuvo en el grupo PCL ($3.69 \times 10^9/L$). Con estos resultados se puede observar que las micotoxinas disminuyeron el número de linfocitos y que las PCL ayudaron a contrarrestar el efecto tóxico de las micotoxinas, principalmente cuando estaba una micotoxina presente en el alimento, además de funcionar como un inmunoestimulante.

En el hematocrito, conteo de eritrocitos, proteínas plasmáticas, monocitos, basófilos, eosinófilos y trombocitos, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos ($P > 0.05$).

ELISA para IgA

Los resultados obtenidos en la prueba de ELISA para IgA se muestran en el Cuadro 8. Se observaron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos ($P < 0.05$). Los grupos AFB+OTA (193.5ng/ml), AFB (198.2 ng/ml) y OTA (205.6 ng/ml), tuvieron los menores valores de IgA intestinal en comparación con los demás tratamientos ($P < 0.05$). Los tratamientos PCL (235.4 ng/ml), AFB+PCL (233.8 ng/ml) y OTA+PCL (231.1 ng/ml), presentaron la mayor cantidad de IgA intestinal, coincidiendo que fueron en los cuales estaban las PCL.

Peso relativo de los órganos

El resultado del peso relativo del bazo, timo y BF de las aves, se muestran en el Cuadro 9. Se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos en el peso relativo de los tres órganos.

Los grupos AFB, OTA y AFB+OTA (0.09%), tuvieron un menor peso del bazo, en comparación con los demás tratamientos ($P < 0.05$). También los tratamientos AFB, OTA y AFB+OTA (0.36%) tuvieron una disminución en el peso del timo, con

respecto a los demás tratamientos ($P < 0.05$). Y por último, se presentó nuevamente un menor peso de la BF en los tratamientos AFB (0.22%), OTA (0.22%) y AFB+OTA (0.21%), con los demás tratamientos ($P < 0.05$). Con estos resultados, se puede observar un efecto negativo de las micotoxinas sobre el peso relativo de los órganos y que las PCL ayudaron a disminuir el efecto tóxico de las micotoxinas en los órganos linfoides, ya que los resultados obtenidos con su inclusión son similares a los de la dieta Testigo.

Prueba de hipersensibilidad tardía

Los resultados obtenidos a la lectura de la prueba de hipersensibilidad tardía, se muestran en el Cuadro 10. Si se observaron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos ($P < 0.05$). En AFB (0.39 mm), OTA (0.37 mm) y AFB+OTA (0.30 mm), fue en los grupos en donde se presentó el menor incremento en el grosor de la membrana interdigital en comparación con los demás tratamientos ($P < 0.05$). También se observó que el mayor grosor de la membrana interdigital se obtuvo en los tratamientos PCL (0.62 mm), AFB+PCL (0.50 mm) y OTA+PCL (0.50 mm), siendo estos en los cuales se agregaron las PCL en la dieta de las aves. Con los resultados obtenidos en la prueba de hipersensibilidad tardía, también se puede observar un efecto negativo de las micotoxinas sobre la respuesta inmune celular, así como una estimulación de esta respuesta inmune por parte de las PCL.

Histología

Las lesiones encontradas a la observación al microscopio de cada corte histológico de los órganos se describen a continuación para cada tratamiento:

Testigo: hígado, riñón, bazo, timo y BF, sin cambios significativos.

AFB: En hígado se observó degeneración vacuolar, hiperplasia de conductos biliares y fibrosis multifocal moderadas con focos de necrosis leve. En riñón no se

observaron cambios significativos. En timo y en bazo se apreció una depleción linfoide moderada. Y en BF se detectó hiperplasia epitelial moderada, depleción linfoide y edema de la vellosidad leves, con presencia de quistes epiteliales.

OTA: En hígado no se apreciaron lesiones significativas, en riñón a pesar de que la OTA es nefrotóxica, tampoco se observaron lesiones importantes en el órgano a nivel estructural. En timo y bazo existió depleción linfoide moderada. En BF se presentó hiperplasia epitelial leve y depleción linfoide moderada, así como edema de la vellosidad leve con presencia de quistes epiteliales.

PCL: Hígado, riñón, bazo, timo y BF sin cambios significativos.

AFB+OTA: En hígado se observó degeneración vacuolar, hiperplasia de conductos biliares y fibrosis multifocal moderadas, también se presentaron focos de necrosis moderada. En riñón no se detectaron lesiones significativas. En timo se apreció depleción linfoide moderada y necrosis multifocal leve. En bazo se observó una depleción linfoide moderada. En BF las lesiones observadas fueron hiperplasia epitelial, depleción linfoide y edema de la vellosidad moderadas, con presencia de quistes epiteliales.

AFB+PCL: En hígado se observó hiperplasia de conductos biliares leve. Riñón sin cambios patológicos aparentes. BF con depleción linfoide leve. Timo sin cambios significativos.

OTA+PCL: Hígado, riñón y BF sin cambios patológicos aparentes. En timo y bazo se observó una depleción linfoide leve.

AFB+OTA+PCL: Hígado con hiperplasia de conductos biliares y fibrosis multifocal leve. Riñón sin cambios patológicos aparentes. En BF, bazo y timo se observó depleción linfoide moderada. En timo se observó necrosis leve.

6. DISCUSIÓN

Parámetros productivos

- Peso y GDP de las aves

En el presente estudio se observaron diferencias estadísticas significativas en peso y GDP de las aves a los 21 días entre los diferentes tratamientos, siendo menor en los tratamientos donde estaban las micotoxinas y al adicionar las PCL se disminuyó el efecto negativo de las mismas, principalmente cuando estaban por separado. Esto mismo fue observado por Aravind *et al.*, (2003), quienes observaron un efecto positivo en el peso de las aves a los 35 días, por la inclusión de PCL (0.05%) en dietas contaminadas con micotoxinas (168 ppb AFB1, 8.4 ppb OTA, 54 ppb zearalenona y 32 ppb T-2). En otro estudio encontraron que la adición de 1 y 1.5 g/kg de glucomananos en dietas contaminadas con 184 µg/kg de AFB1, mejoró el peso de las aves a los 42 días (Kamalzadeh *et al.*, 2009). Otros autores no observaron efectos de las PCL, Santin *et al.*, (2003a) demostraron una disminución en el peso de aves de 42 días, por la inclusión de AFB (1 ppm), pero no observaron un efecto positivo por la inclusión de las PCL (0.20%). Esto coincide con lo realizado por Gómez *et al.*, (2009), quienes reportaron que la inclusión de PCL (0.05%) no tuvo un efecto en dietas contaminadas con AFB1 (400 mg/ton), esto mismo fue observado por Basmacioglu *et al.*, (2005), que utilizaron PCL (0.5 g y 1 g/kg) en dietas contaminadas con AFB1 (1 ppm) y reportaron que las PCL no tuvieron efecto en el peso de las aves. Santin *et al.*, (2003b) encontraron que dosis de 500 ppb de OTA afectan el peso de las aves a los 21 y 42 días de edad, y que la adición de 0.10% de PCL no redujo el efecto tóxico de la micotoxina. Estos mismos autores (Santin *et al.*, 2006) encontraron que la adición de PCL (1 ppm) en dietas contaminadas con micotoxinas (250 y 500 ppb de AFB1 y OTA solas o en combinación) no tuvieron efecto sobre el peso de las aves a los 21 y 42 días en los tratamientos donde estaba OTA presente, concluyendo que las PCL funcionan mejor contra AFB1. Las diferencias con estos estudios pueden deberse a que en el presente

trabajo se utilizó una dosis más alta de PCL (1,500 ppm) en dietas contaminadas con micotoxinas, por lo cual, si se pudo ver un efecto de las PCL. En otros estudios realizados, si se presentó un aumento en el peso de aves cuya dieta fue suplementada con PCL, con respecto a aves con una dieta normal (Santin *et al.*, 2001; Kocher *et al.*, 2005; Arce *et al.*, 2005 y 2008; Gao *et al.*, 2008). Otros autores no reportaron diferencias en peso y GDP en aves suplementadas con PCL en su dieta (Iji *et al.*, 2001; Mohamed *et al.*, 2008 y Al-Mansour *et al.*, 2011).

Las micotoxinas si causaron una disminución en peso y GDP de las aves en el presente trabajo. Ananda *et al.*, (2010) reportaron que 400 y 600 ppb de AFB1 disminuyen el peso de las aves a las 6 semanas de edad. Los resultados obtenidos por Verma *et al.*, (2004), muestran un menor peso en aves de 4 y 7 semanas de edad, con dietas contaminadas con AFB1 (0.5, 1 y 2 mg/kg) y OTA (1, 2 y 4 mg/kg), siendo más evidente cuando estaban de manera combinada las micotoxinas en la dieta. En los primeros estudios realizados con las dos micotoxinas, se describió un efecto negativo en el peso de las aves a los 21 días, alimentadas con AFB1 (2.5 ppm) y OTA (2.0 ppm), el cual se vio afectado 12% cuando están solas y 40% cuando están en combinación (Huff y Doerr, 1981; Huff *et al.*, 1984). En otro trabajo realizado, observaron un efecto detrimental en el peso de las aves a los 42 días, alimentadas con AFB1 (200 ppb) y OTA (200 ppb), solas o mezcladas, siendo mayor la disminución en el peso cuando estaban las dos micotoxinas presentes (Sakhare *et al.*, 2007). Esto coincide con lo realizado por Sawarkar *et al.*, (2011), quienes encontraron que dosis de 100 ppb de AFB y OTA en combinación, disminuyen el peso de las aves. Se ha reportado que dosis de 1-2 mg/kg de OTA, disminuyen considerablemente el peso y la GDP de las aves a los 35 días de edad (Joo *et al.*, 2013).

En otros estudios realizados no se observó una disminución en el peso de las aves por la inclusión de micotoxinas. Tejada *et al.* (2008) observaron que niveles de 500 ppb de AFB no causan disminución del peso en aves de 3 semanas de

edad, lo que coincide con lo reportado por Magnoli *et al.*, (2011) (50 µg/kg de AFB1 en aves de 6 semanas de edad). A diferencia de otros estudios, donde se utilizaron dietas contaminadas con 200 ppb de AFB1 y OTA (Kalorey *et al.*, 2005) y 250 y 500 ppb de AFB y OTA (Santin *et al.*, 2006) solas o en combinación, no observaron un efecto detrimental en el peso de las aves a los 21 y 42 días de edad.

En el presente estudio los tratamientos PCL, AFB+PCL, OTA+PCL, mostraron mejores valores numéricos en peso y GDP, mostrando un efecto positivo a la adición de PCL, teniendo un mejor efecto las PCL en la presencia de AFB que cuando estaba presente OTA, lo cual fue reportado por Raju y Devegowda (2002), quienes demostraron *in vitro* que las PCL en dosis de 1000 ppm, tienen un porcentaje más alto de unión hacia AFB (300 ppb) cuando está sola o en combinación con OTA (81.6% AFB, 63.9% AFB+OTA), que contra OTA (2 ppm) sola o en combinación (25.7% OTA, 10.8% AFB+OTA). Estos autores también observaron que al adicionar las PCL a las dietas donde estaban las dos micotoxinas presentes, el porcentaje de unión de las PCL con las micotoxinas disminuye si estas están presentes en combinación, lo cual se puede deber a la saturación de los sitios reactivos de las PCL. Este mismo efecto se observó en el presente trabajo, ya que no se detectó ninguna diferencia entre los tratamientos cuando estaban presentes las dos micotoxinas (AFB+OTA y AFB+OTA+PCL).

- Consumo de alimento

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se presentaron diferencias en el consumo de alimento en la semana 3 y en consumo acumulado entre los diferentes tratamientos, siendo menor cuando estaban las dos micotoxinas presentes. En otro estudio, también se reportó una disminución en el consumo de aves de 4 y 7 semanas de edad alimentadas con dietas con AFB (0.5, 1 y 2 mg/kg) y OTA (1, 2 y 4 mg/kg), el consumo se vio más afectado cuando estaban las dos micotoxinas presentes en la misma dieta (Verma *et al.*, 2004). Lo mismo

fue reportado por Aravind *et al.*, (2003), que vieron una disminución en el consumo de las aves a las 5 semanas de edad, por efecto de la inclusión de micotoxinas en dosis bajas (AFB, OTA, zearalenona y T-2). Santin *et al.*, (2003b) encontraron que dosis de 500 ppb de OTA disminuyen el consumo de alimento en aves de 21 y 42 días y que la adición de 0.10% de PCL no minimizó el efecto de OTA. Celyk *et al.*, (2003) describieron que AFB1 produce una disminución en el consumo de alimento en aves a las 5 semanas y Ananda *et al.*, (2010) vieron que dosis de 400 ppb y mayores afectan el consumo de las aves a las 6 semanas de edad. En otro estudio se observó una disminución en el consumo de alimento de aves de 21 días de edad con dietas contaminadas con AFB y OTA, solas o en combinación (Santin *et al.*, 2006). En el presente trabajo, posiblemente se presentó un efecto sinérgico cuando estaban las dos micotoxinas presentes, lo cual coincide con los resultados obtenidos en los trabajos realizados previamente.

En otros trabajo realizado por Tejada *et al.*, (2008) (utilizaron 500 ppb de AFB1), no observaron disminución en consumo de alimento de aves por acción de las micotoxinas. Magnoli *et al.*, (2011) y Kamalzadeh *et al.*, (2009) encontraron que dosis bajas de 50 µg/kg y 184 µg/kg de AFB1 no afectan el consumo de alimento de aves durante 6 semanas. Gómez *et al.* (2009) encontraron que no existe diferencia en el consumo de las aves cuando se adicionan dosis bajas de AFB (400 ppb) solas o en combinación con 0.05% de PCL en aves de 21 días de edad. En otros estudios realizados, no reportaron cambios en el consumo de alimento de las aves por la adición de las PCL (Iji *et al.*, 2001; Santin *et al.*, 2001; Arce *et al.*, 2005, 2008; Gao *et al.*, 2008; Kamalzadeh *et al.*, 2009 y Al-Mansour *et al.*, 2011).

- Conversión alimenticia (CA)

En la CA no se observó diferencia entre los diferentes tratamientos, lo cual coincide con lo reportado en otros estudios en donde se utilizaron PCL+AFB1 (Gómez *et al.*, 2009; Celyk *et al.*, 2003); PCL o sus fracciones (Iji *et al.*, 2001; Santin *et al.*, 2001; Arce *et al.*, 2008; Mohamed *et al.*, 2008; Al-Mansour *et al.*,

2011); AFB1 (Tejada *et al.*, 2008; Magnoli *et al.*, 2011); OTA+PCL (Santin *et al.*, 2003b) y AFB+OTA+PCL (Sawarkar *et al.*, 2011; Santin *et al.*, 2006). Gao *et al.*, (2008) y Kamalzadeh *et al.*, (2009) si observaron que se mejora la CA por la inclusión de PCL y glucomananos de SC en aves de 42 días de edad. Verma *et al.*, (2004) indicaron un aumento en la CA en aves de 4 y 7 semanas de edad, debido a la inclusión de varios niveles de AFB1 y OTA, solas en combinación, lo que coincide con lo observado por Aravind *et al.*, (2003) que encontraron que la CA aumenta por la inclusión de dosis bajas de micotoxinas (AFB, OTA, zearalenona y T-2) en aves de 5 semanas y disminuye cuando se incluyen en la dieta fracciones de PCL (0.5%), ese mismo efecto fue observado por Ananda *et al.*, (2010) quienes utilizaron dosis de 200, 400 y 600 ppb de AFB1 y vieron un aumento en la CA en aves de 6 semanas de edad. Santin *et al.*, (2003a) no observaron cambios en CA por la adición de AFB1 y AFB1+PCL, pero si un efecto positivo debido a las PCL cuando estaban solas en el alimento. Los autores sugieren que el aumento observado en las vellosidades intestinales por la inclusión de las PCL es la causa de esta mejora en CA.

Peso relativo de los órganos

Se presentó una disminución en el peso relativo de los órganos (bazo, timo y BF), de las aves a las cuales se les adicionaron las micotoxinas en su dieta (AFB, OTA y AFB+OTA). Lo mismo fue reportado por Verma *et al.*, (2004), quienes utilizaron AFB (0.5, 1 y 2 mg/kg) y OTA (1, 2 y 4 mg/kg) solas o en combinación en dietas de pollo de engorda de 1-49 días, y reportaron un menor peso de BF de las aves que consumieron las dosis más altas de AFB1 y de OTA cuando están en combinación. Sakhare *et al.*, (2007) reportaron un menor peso de bazo, timo y BF de aves a los 21 y 42 días, por la inclusión de AFB (200 ppb) y OTA (200 ppb), solas o de manera combinada, lo mismo fue observado en el peso de los mismos órganos por Kalorey *et al.*, (2005) con dosis bajas de AFB1 y OTA (200 ppb). En otro estudio realizado por Santin *et al.*, (2003b) no encontraron diferencias en el peso de la BF en aves de 21 días suplementadas con 500 ppb de OTA en la dieta,

en cambio Elaroussi *et al.*, (2008) señalaron que dosis de 800 ppb de OTA disminuyen el peso de la BF en aves de 5 semanas de edad. Ananda *et al.*, (2010) concluyeron que dosis de 200 ppb de AFB1 y mayores afectan el peso de la BF en aves de 6 semanas. Raju y Devegowda (2002) encontraron que dosis de 300 ppb de AFB y 2 ppm de OTA, solas o en combinación, afectan de manera negativa el peso de BF y timo en aves de 5 semanas, y que la inclusión de glucomananos de PCL (0.1%) mejoró el peso de estos órganos, estos autores indicaron que el peso del bazo no se afectó por las micotoxinas. En el presente estudio, los resultados del peso relativo de los órganos de los tratamientos Testigo y donde estaban las PCL, no tuvieron diferencias, con lo cual se puede concluir que las micotoxinas si afectaron el peso de los órganos linfoides, lo que puede provocar un efecto detrimental en la respuesta inmune. También se observó que la adición de las PCL, ayudó a disminuir el daño de las micotoxinas en los órganos. Esta reducción en el peso de los órganos del sistema inmune, se asocia con la depleción de células linfoides y a los cambios degenerativos y necrosis causados por las micotoxinas, además de que los órganos del sistema inmune son más sensibles a bajas dosis de micotoxinas que otros órganos (Hoerr *et al.*, 1981; Al-Anati y Petzinger, 2006).

Respuesta inmune humoral

- Prueba de Inhibición de la hemoaglutinación (HI)

No existió diferencia en la prueba de HI entre los tratamientos en los resultados de títulos de anticuerpos para enfermedad de Newcastle (ENC) a los 21 días, aunque numéricamente si se observaron mejores títulos en los grupos Testigo y donde estaban las PCL, esto puede ser relacionado con lo observado por Gao *et al.*, (2008), quienes hallaron que la suplementación de levaduras de SC mejoró el título de anticuerpos contra ENC en aves de 35 días de edad, no así en las de 21 días. Mehdi y Hasan (2012) encontraron un aumento en el título de anticuerpos contra ENC de pollo de engorda, por la adición de MOS de PCL en la dieta. Gómez *et al.*, (2009) reportaron una disminución en los títulos de anticuerpos

contra ENC en aves de 21 días suplementadas con AFB1 (400 mg/ton). Otros autores demostraron que la inclusión de OTA en la dieta, provoca una disminución en los títulos contra ENC en las aves (Stoev *et al.*, 2000; Elaroussi *et al.*, 2008). Otros estudios se han realizado para determinar el efecto de las PCL en dietas contaminadas con AFB, Santin *et al.* (2003a), reportan un efecto negativo en los títulos de anticuerpos contra ENC en aves de 18 y 25 días de edad, cuyas dietas estaban contaminadas con AFB (1 ppm), con respecto a los grupos en donde se añadieron PCL (0.2%), lo mismo fue observado por Gabal y Azzam (1998). Se ha reportado que dosis de 2 ppm de OTA, provocan en las aves una disminución en los títulos de anticuerpos contra ENC (Santin *et al.*, 2002). Raju y Devegowda (2002), encontraron que AFB (300 ppb) y OTA (2 ppm) solas o en combinación, disminuyen el título de anticuerpos contra ENC y que la inclusión de glucomananos de PCL (0.1%) en la dieta aumentó los títulos. En otros estudios donde utilizaron AFB1 y OTA (200 ppb de cada micotoxina), observaron menores títulos de anticuerpos contra ENC en aves de 21 y 42 días, siendo más bajos los títulos cuando estaban AFB1 y OTA juntas en la dieta, los autores concluyeron que esto es debido al sinergismo que existe entre las dos micotoxinas (Sakhare *et al.*, 2007; Kalorey *et al.*, 2005).

- IgA en contenido intestinal

En el presente estudio se presentó diferencia en el contenido de IgA entre los diferentes tratamientos, siendo más altos los niveles de IgA cuando se incluyeron las PCL (PCL, AFB+PCL y OTA+PCL), lo cual también fue indicado por Gao *et al.*, (2008), quienes al adicionar levaduras de SC observaron un aumento en el contenido de IgA a los 21 y 42 días de edad. Gómez *et al.*, (2009) no observaron un aumento en la secreción de IgA en aves de 21 días por la inclusión de PCL (0.05%). Probablemente la diferencia con los resultados obtenidos por Gómez *et al.*, (2009), se debe a que la dosis de PCL (1,500 ppm) fue más alta en el presente estudio. Los resultados demuestran que las micotoxinas también disminuyeron la producción de IgA, afectando la respuesta inmune en tracto digestivo.

Este aumento en el contenido de IgA secretora en intestino por la adición de las PCL, puede deberse a un aumento en la secreción de contenido intestinal, lo que conlleva a una mayor protección de la mucosa y de las vellosidades intestinales, contra el daño producido por patógenos (Gao *et al.*, 2008).

Respuesta inmune celular

- Prueba de hipersensibilidad tardía

En la evaluación de la respuesta inmune celular mediante la prueba de hipersensibilidad tardía, se observó un aumento en el grosor de la membrana interdigital en las aves de los tratamientos suplementados con PCL, a diferencia de los grupos donde se adicionaron las micotoxinas. Gómez *et al.* (2009); reportaron que en dietas adicionadas con AFB (400 ppb), hay un menor aumento en el grosor de la membrana interdigital con respecto a aves alimentadas con PCL (500 ppm) a los 21 días de edad, lo que pudiera estar determinado por una inmunosupresión en las aves. En otros estudios (Sakhare *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2004; Kalorey *et al.*, 2005) también observaron una disminución en el grosor de la membrana interdigital de aves con dietas suplementadas con AFB1 y OTA, solas o en combinación en dosis bajas y altas, siendo menor el grosor cuando estaban las dos micotoxinas presentes en la misma dieta. En estos resultados se pudo observar que en los grupos donde estaba presente OTA, fue donde se obtuvo el menor grosor de la membrana interdigital, lo que coincide con lo reportado de que OTA afecta más la respuesta inmune celular (Devegowda y Murthy, 2005).

- Hemograma

En este estudio se observó una disminución en el conteo de leucocitos, heterófilos y linfocitos en los tratamientos donde estaban presentes las micotoxinas. Esto mismo fue reportado por Gómez *et al.* (2009), quienes observaron que la inclusión de AFB1 (400 mg/ton) afectó el conteo de leucocitos, heterófilos y linfocitos. En

otro experimento realizado por Basmacioglu *et al.*, (2005), reportaron efectos detrimentales en el conteo de linfocitos y trombocitos en aves de 21 días por la inclusión de AFB1 (1 ppm) en la dieta y determinaron que la adición de PCL (1 g/kg) en las dietas con AFB1, ayudo a mejorar significativamente los efectos adversos de la AFB1, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente estudio. Sakhare *et al.*, (2007), observaron diferencias en el conteo de leucocitos en aves de 21 y 42 días, por la adición de AFB (200 ppb) y OTA (200 ppb) solas o en combinación. Moura *et al.*, (2004) administraron OTA en pollitos de 1 día y observaron una disminución en el conteo de leucocitos totales. La disminución en las poblaciones de leucocitos, linfocitos y heterófilos puede deberse a lo descrito por Celik *et al.*, (2000), quienes demostraron que en la inmunodepresión que causan las micotoxinas, no sólo se deprimen las funciones celulares, sino también se disminuye el número de linfocitos T en sangre periférica y en tejidos linfoides. Los tratamientos en los cuales se presentaron los resultados más bajos en el hemograma fueron donde estaba OTA presente, lo cual puede ser asociado a que afecta más la respuesta inmune celular, también se observó que las PCL favorecieron el aumento de las poblaciones celulares, implicadas de forma importante en la respuesta inmune. Kalorey *et al.*, (2005) no observaron efecto en el conteo de leucocitos totales de aves a los 21 y 42 días de edad con dietas suplementadas con AFB1 (200 ppb) y OTA (200 ppb), solas o en combinación y que la inclusión de PCL (0.05%) en las dietas, no tuvo efecto contra AFB1. En otro estudio realizado por Sawarkar *et al.*, (2011) encontraron que una combinación de AFB+OTA en dosis de 100 ppb, provoca una disminución en el conteo de eritrocitos y leucocitos totales en aves de 42 días.

En los resultados de hematocrito, conteo de eritrocitos, basófilos, eosinófilos, trombocitos y proteínas plasmáticas no se observaron diferencias entre los tratamientos en el presente trabajo, lo cual coincide con otros estudios realizados en donde contaminaron dietas de pollo de engorda con AFB1 (200 ppb) y OTA (200 ppb), y no observaron disminución en el número de eritrocitos (Kalorey *et al.*,

2005; Sakhare *et al.*, 2007), Aravind *et al.*, (2003) tampoco reportaron cambios en el conteo de eritrocitos de aves a las 5 semanas, por la inclusión de dosis bajas de micotoxinas (168 ppb AFB1, 8.4 ppb OTA, 54 ppb zearalenona y 32 ppb T-2) y fracciones de PCL, pero si observaron una disminución en el hematocrito por acción de las micotoxinas. Basmacioglu *et al.*, (2005) reportaron un efecto negativo de AFB1 (1 ppm) en el conteo de eritrocitos y en el hematocrito de aves de 21 días de edad, siendo contrarrestado este efecto cuando se añadieron a la dieta PCL (0.5 y 1 g/kg). Al-Mansour (*et al.*, 2011) no encontraron diferencias en el conteo de eritrocitos y leucocitos totales con la inclusión de levaduras de SC con respecto a una dieta control.

Los resultados obtenidos sugieren que con la adición de las micotoxinas en dietas de aves, se presentó una depleción linfóide y por consiguiente la disminución del peso relativo de los órganos como timo, bazo y BF, provocando que hubiera un menor número de células involucradas en la respuesta inmune celular de las aves, lo cual también fue reportado por otros autores (Celyk *et al.*, 2000; Verma *et al.*, 2004; Al-Anati y Petzinger, 2006; Elaroussi *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2009). Además, las PCL pudieran atraer células del sistema inmune y otros factores inmunes al tracto gastrointestinal, resultando en la formación de una barrera para los antígenos en el tracto intestinal, con lo cual, se podría mejorar la respuesta inmune y el rendimiento de los animales (Santin *et al.*, 2003a).

Histología

En el presente trabajo, el mayor grado de lesión de hígado, bazo, BF y timo se observó en los grupos de aves alimentadas con las micotoxinas. Cuando se adicionaron las PCL se observó una disminución en la severidad de los cambios patológicos, cuando estaba una micotoxina presente (AFB+PCL y OTA+PCL). Esto concuerda con lo observado por Karaman *et al.*, (2005), quienes contaminaron dietas para aves con AFB (2 mg/kg) y reportaron degeneración grasa y necrosis en hígado, además de depleción linfóide en bazo, BF y timo; y

que la adición de glucomananos de SC (1 g/kg), produce una disminución en la severidad de las lesiones. Kalorey *et al.*, (2005) y Sakhare *et al.*, (2007) encontraron que 0.2 ppm de AFB1 provoca cambios degenerativos en el parénquima del hígado, con inflamación y degeneración vacuolar, además de focos de necrosis con infiltración linfocitaria en aves de 21 y 42 días de edad. Estos autores observaron en el bazo necrosis con depleción linfoide por la inclusión de AFB1 y OTA (0.2 ppm) solas o combinadas, esto mismo fue reportado en BF y timo, siendo más importante la depleción cuando estaban las dos micotoxinas presentes. Todas estas lesiones coinciden con lo encontrado en el presente estudio. Santin *et al.*, (2003a) utilizaron 1 ppm de AFB1 en dietas de aves y encontraron degeneración vacuolar severa e hiperplasia de conductos biliares en hígado y depleción linfoide en BF a los 21 y 42 días; y que al adicionar 0.20% de PCL, no se presentó una disminución en las lesiones en estos órganos.

En este estudio no se encontraron lesiones en riñón por la inclusión de las micotoxinas. Santin *et al.*, (2002) observaron hipertrofia de células epiteliales en túbulos renales proximales en riñón, degeneración vacuolar e hiperplasia de conductos biliares en hígado y depleción linfoide en BF de aves alimentadas con 2 ppm de OTA. Probablemente las diferencias en el daño renal sean debido a la dosis alta que utilizaron estos autores. Elaroussi *et al.*, (2008) utilizaron 800 ppb de OTA en dietas de aves, en riñón reportaron degeneración granular, núcleos picnóticos en células epiteliales de los túbulos contorneados proximales y degeneración de los corpúsculos de Malpighi, en BF observaron inflamación de los folículos, acumulación de secreciones en la región apical y depleción linfoide.

7. CONCLUSIONES

1. La adición de micotoxinas en las dietas de los grupos AFB, OTA y AFB+OTA, tuvo un efecto negativo en el peso y GDP de las aves a los 21 días de edad. Y de AFB+OTA en el consumo acumulado.
2. La inclusión de 1,500 ppm de PCL en la dieta, contrarrestó el efecto negativo de las micotoxinas en el peso y GDP, principalmente cuando estas estaban por separado en la dieta, actuando mejor contra AFB1.
3. La inclusión de las 1,500 ppm de PCL incrementó la respuesta inmune celular (leucocitos, linfocitos y heterófilos) y la cantidad de IgA intestinal, por lo cual, se puede concluir que una de sus funciones principales es como estimulante del sistema inmune. Además, disminuyeron los daños producidos a nivel estructural por las micotoxinas en los órganos linfoides como son bazo, BF y timo.
4. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se sugiere seguir realizando estudios con las dos micotoxinas (AFB y OTA) por mayor tiempo (aves de 0-49 días de edad), para observar si la suplementación de las micotoxinas tiene mayor efecto sobre los parámetros productivos y el sistema inmune y para poder determinar si la inclusión de las PCL puede ayudar a contrarrestar los efectos de las micotoxinas durante este periodo de tiempo.

8. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

AFB: aflatoxina B
AFB1: aflatoxina B1
AFM: aflatoxina M
AFM1: aflatoxina M1
AFP1: aflatoxina P1
AFQ1: aflatoxina Q1
APC: antibióticos promotores del crecimiento
Aw: actividad de agua
BF: bolsa de Fabricio
CEIEPAv: Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola
CA: conversión alimenticia
CPA: células presentadoras de antígeno
CPH: complejo principal de histocompatibilidad
DM: divertículo de Meckel
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
ENC: enfermedad de Newcastle
FAO: Organización para la Alimentación y la Agricultura
FES: Facultad de Estudios Superiores
GDP: ganancia diaria de peso
IH: inhibición de la hemoaglutinación
MOS: manano-oligosacáridos
NDV: Newcastle Disease Virus
OTA: ocratoxina A
OTB: ocratoxina B
OTC: ocratoxina C
PBS: solución amortiguadora de fosfatos (phosphate buffered saline)
PCL: paredes celulares de levaduras
PIB: producto interno bruto
PP: placas de Peyer
SC: *Sacharomyces cerevisiae*
TC: tonsilas cecales
TE: tonsilas esofágicas
UNA: Unión Nacional de Avicultores
UNIGRAS: Unidad de Investigación en Granos y Semillas
YCW: yeast cell walls

9. REFERENCIAS

1. ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER, JS. Cellular and molecular immunology. 3rd Ed Saunders press, Philadelphia U.S.A.1997.
2. AFZALI N, DEVEGOWDA G. Ability of modified mannan-oligosaccharide to counteract aflatoxicosis in broiler breeder hens. Poult Sci 1999; 78 (Suppl. 1) 228.
3. AL-ANATI L, PETZINGER E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. J Vet Pharmacol Ther 2006; 29 (2): 79-90.
4. AL-MANSOUR S, AL-KHALF A, AL-HOMIDAN I, FATHI MM. Feed efficiency and blood hematology of broiler chicks given a diet supplemented with yeast culture. Int J Poult Sci 2011; 10 (8): 603-607.
5. ANANDA MG, SHAMBULINGAPPA BE, ANANDA KJ. Studies on tolerance limit of aflatoxin in commercial broilers. Libyan Agric Res Cen J Intl 2010; 1 (3): 177-181.
6. ARAVIND KL, PATIL SV, DEVEGOWDA G, UMAKANTHA B, GANPULESP. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. Poult Sci 2003; 82 (4): 571-576.
7. ARCE MJ, AVILA GE, LÓPEZ CC, GARCÍA EA, GARCÍA GF. Efecto de paredes celulares (*Sacharomyces cerevisiae*) en alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos. Téc Pecu Méx 2005; 43:155-162.
8. ARCE MJ, AVILA GE, LÓPEZ CC. Comportamiento productivo y cambio morfológico en las vellosidades intestinales del pollo de engorda a 21 días de edad con el uso de paredes celulares de *Sacharomyces cerevisiae*. Vet Mex 2008; 39 (2):223-228.
9. ÁRPÁD B, RADOMIR L. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. F Sci Technol 1999; 10:223-228.

10. ASAO TG, BUCHI MM, ABDEL KADER SB, CHANG EL, WICH EL, WOGON GN. The structure of aflatoxins B1 and G1. *J Am Chem So* 1963; 85:1706-1707.
11. BASMACIOGLU H, OGUZ H, ERGUL M, COL R, BIRDANE YO. Effect on dietary esterified glucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. *Czech J Anim Sci* 2005; 50: 31-39.
12. BEFUS AD, JOHNSTON N, LESLIE GA, BIENENSTOCK J. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer's patches. *J Immunol* 1980; 125 (6): 2626–2632.
13. BOUTRIF E, BESSY C. Global significance of mycotoxins and phycotoxins. In: *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*. Koe WJ, Samson RA, Van Egmond HP, Gilbert J, Sabino, M Editores. Ponsen and Looyen, Wageningen, The Netherlands. 2001: 3-16.
14. BUCHI G, RAE ID. The structure and chemistry of aflatoxins. In: *Aflatoxins*. Goldblatt LA Editores. Academic Press, New York. 1969:55.
15. BUCY RP, CHEN CL, CIHAK J, LÖSCH U, COOPER M. Avian T cells expressing $\gamma\delta$ receptors localized in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J Immunol* 1988; 141: 2200-2205.
16. BURNS RB. Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Res Vet Sci* 1982; 32: 359–367.
17. CABAÑES J, BRAGULAT MR, CASTELLÁ G. Ochratoxin A Producing Species in the Genus *Penicillium*. *Toxins (Basel)* 2010; 2 (5): 1111-1120.
18. CAMPBELL ML Jr, DOERR JA. Immunity in young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poult Sci* 1981; 60:1633.
19. CAMPBELL ML Jr, MAY JD, HUFF WE, DOERR JA. Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poult Sci* 1983; 62: 2138-2144.
20. CAST. *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems*. Council for agricultural science and technology. Ames, Iowa 2003: 139.

21. CASTELLA G, LARSEN TO, CABANES J, SCHMIDT H, ALBORESI A, NIESSEN L, FÄRBER P, GEISEN R. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Syst Appl Microbiol* 2002; 25 (1): 74–83.
22. CELYK I, OGUZ H, DEMET O, DONMEZ HH, BOYDAK M, SUR E. Efficacy of polypyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. *Br Poult Sci* 2000; 41: 430-439.
23. CELYK K, DENLY M, SAVAS T. Reduction of toxic effects of aflatoxin B1 by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicks diets. *R Bras Zootec* 2003; 32(3): 615-619.
24. CHAE BJ, LOHAKARE JD, MOO WK, LEE SL, PARK HY, HAHN TW. Effects on supplementation of β -glucan on the growth performance and immunity in broilers. *Res Vet Sci* 2006; 80:291-298.
25. CHRISTENSEN CM, SAUER DB. Microflora in Storage of Cereal Grains and their Products. American Association of Cereal Chemists. St. Paul MN. 1982: 219-240.
26. CORRIER DE, DELOACH JR. Evaluation of Cell Mediated, cutaneous basophilic hypersensitivity in young chickens by an interdigital skin test. *Poultry Sci* 1990; 69 (3): 403-408.
27. CULLEN JM, NEWBERNE PM. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance 1994. Academic Press San Diego, p. 3-26.
28. DEL RÍO GJC. Las micotoxinas en granos y alimentos balanceados, Situación actual. Curso Actualidades en Micotoxinas, AMENA 2007.
29. D' MELLO JPF, MACDONALD AMC. Mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol.* 1997; 69: 155-166.
30. D'MELLO JPF, MACDONALD AMC, COCHRANE MP. A preliminary study of potential for mycotoxin production in barley grain. *Asp Appl Biol* 1993; 36: 375-382.

31. DETROY RW, LILLEHOJ EB, CIEGLER A. Aflatoxin and related compounds. In: Microbial Toxins vol. 6. Ciegler A *et al.*, Eds. Academic Press, New York. 1971: 4-178.
32. DEVEGOWDA G, RAJU MVLN, SWAMY HVLN. Mycotoxins: Novel solutions for their counteraction. *Feedstuffs* 1998, 70 (50):12-17.
33. DEVEGOWDA G, MURTHY TNK. Mycotoxins: their effects in poultry and some practical solutions. In: *The Mycotoxin Blue Book 2005*, Nottingham University Press England, p. 25-56.
34. DUTTON MF. Enzymes and Aflatoxin Biosynthesis. *Microbiol Rev* 1988; 52 (2): 274-295.
35. EDELMAN AS, SÁNCHEZ LP, ROBINSON EM, HOCHWALD MG, THORBECKE JG. Primary and secondary wattle swelling response to phytohemagglutinin as a measure of immunocompetence in chickens. *Avian Dis* 1985; 30 (1):105-111.
36. ELAROSSI MA, MOHAMED FR, EL BARKOUKY EM, ATTA AM, ABDOU AM, HATAB MH. Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. *Avian Pathol* 2008; 35 (4): 263-269.
37. GABBAL MA, AZZAM AH. Interaction of aflatoxin in the feed and immunization against selected infectious diseases in poultry. *Avian Path* 1998; 27: 290-295.
38. GAO J, ZHANG HJ, YU SH, WU SG, YOON I, QUIGLEY J, GAO YP, QI JH. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poult Sci* 2008; 87:1377-1384.
39. GIMENO A, MARTINS LM. *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos 2006*. Special Nutrients, Inc. Miami, Florida USA.
40. GLICK B. The immune response in the chicken: lymphoid development of the bursa of Fabricius and thymus and avian immune response role for the gland of Harder. *Poult Sci* 1978; 57:1441-1444.
41. GÓMEZ VG, CORTÉS CA, LÓPEZ CC, ARCE MJ, VÁSQUEZ PC, ÁVILA GE. Comportamiento productivo y respuesta inmune de pollos alimentados

- con dietas sorgo-soya con y sin aflatoxina y paredes celulares de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). *Téc Pecu Méx* 2009; 47 (3): 285-297.
42. GÓMEZ VG, LÓPEZ CC, MALDONADO BC, ÁVILA GE. El sistema inmune digestivo en las aves. *Invest y Ciencia* 2010; 48: 9-16.
 43. GUO Y, ALI RA, QURESHI MA. The influence of β -glucan on immune responses in broiler chicks. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2003; 25(3):461-472.
 44. HARADA T, KAWAMINAMI H, MIURA NN, ADACHI Y, NAKAJIMA M, YADOME, T, OHNON. Mechanism of enhanced hematopoietic response by soluble β -glucano SCG in cyclophosphamide-treated mice. *Microbiol Immunol* 2006; 50: 687-700.
 45. HARWIG J, KUIPER-GOODMAN T, SCOTT PM. Microbial food toxicants: ochratoxins. En: *Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin*. Reichcigl M. (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. 1983: 193-238.
 46. HEDGE SN, ROLLS BA, TURVEY A, COATES ME. Influence of gut microflora on the lymphoid tissue in the chicken (*Gallus domesticus*) and Japanese quail (*Coturnix coturnix Japonica*). *Comp Biochem Physiol* 1982; 72A: 205–209.
 47. HIDA S, MIURA NN, ADACHI Y, NAKAJIMA M, OHNO N. β -glucano derived from zymosan acts as an adjuvant for collagen-induced arthritis. *Microbiol Immunol* 2006; 50:453-461.
 48. HODGES RD. The circulatory system. In: *The Histology of the Fowl*, Academic Press, London. 1974: 151-241.
 49. HOERR FJ, CARLTON WW, YAGEN B. Mycotoxicosis caused by a single dose of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens. *Vet Path* 1981; 18: 652-664.
 50. HOOGE DM. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide 1993-2003. *Int J Poult Sci* 2004; 3 (3):163-174.
 51. HUFF WE, WYATT RD, TUCKER TL, HAMILTON PB, Ochratoxicosis in the broiler chicken. *Poult Sci* 1974; 53 (4): 1585-1591.

52. HUFF WE, DOERR JA. Synergism between aflatoxin and ochratoxin in broiler chickens. *Poult Sci* 1981; 60:550-555.
53. HUFF WE, DOERR JA, WABECK CJ, CHALOUPKA GW, MAY JD, MERKLEY JW. The individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin on various processing parameters of broiler chickens. *Poult Sci* 1984; 63(11):2153-2161.
54. HUFF WE, KUBENA LF, HARVEY RB, PHILLIPS TD. Efficacy of hydrated sodium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxina and ochratoxin A. *Poult Sci* 1992; 71 (1): 64-69.
55. HUWIG A, FREIMUND S, KAPPELI O, DUTLER H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett* 2001; 122(2):179-188.
56. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, IARC Scientific Publications 1993 Vol. 56. IARC, Lyon.
57. IJI AP, SAKI AA, TIVEY RD. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. *J Sci Food Agric* 2001; 81: 1186-1192.
58. INEGI. Tláhuac: Cuaderno de información básica Delegacional. INEGI, México, 1992. disponible en: <http://www.inegi.org.mx>.
59. JAMROZ D, JACOBSEN K, BACH K, WILIEZKEWIEZ J, ORDA J. Digestibility and energy value of non-starch polysaccharides in young chickens, ducks and geese fed diets containing high amounts of barley. *Comp Biochem Physiol* 2002; 131:657-668.
60. JECFA 56th. Joint FAO/WHO Expert Committee on food Additives 56th report. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2001, paper 74. World Health Organization Food Additives Series 47. World Health Organization. Geneva, Switzerland.

61. JEURISSEN SHM, JANSE EM, KOCH G. Meckel's diverticulum: a gut associated lymphoid organ in chickens. In Histophysiology of the Immune System, Editores Fossum S, Rolstad B. Plenum Publishing Corporation, New York. 1988:599-605.
62. JEURISSEN SHM, JANSE EM. The use of chicken-specific antibodies in veterinary research involving three other avian species. Vet Q 1998; 20 (4): 140-143.
63. JOO DY, KANG WC, AN KB, AHN SJ. Effects of ochratoxin A and preventive action of a mycotoxin-deactivation product in broiler chickens. Vet Med Zoot 2013; 61: 22-29.
64. JOUANY JP, YIANNIKOURIS A, BERTIN G. How yeast cell wall components can alleviate mycotoxicosis in animal production and improve the safety of edible animal products. J Anim Feed Sci 2005; 14:171-191.
65. KAJIWARA E, SHIGETA A, HORIUCHI H, MATSUDA H, FURUSAWA S. Development of Peyer's Patch and cecal tonsil in gut associated lymphoid tissues in chicken embryo. J Vet Med Sci 2003; 65 (5):607-614.
66. KALOREY DR, KURKURE NV, RAMGAONKAR JS, SHAKARE PS, WARKE S, NIGOT NK. Effect of polyherbal feed supplement "Growell" during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxicoses in broilers. Asian-Aust J Anim Sci 2005; 18 (3):375-383.
67. KAMALZADEH A, HOSSEINI A, MORADI S. Effects of yeast glucomannan on performance of broiler chickens. Int J Agric Biol 2009; 11:49-53.
68. KARAMAN M, BASMACIOGLU H, ORTATATLI M, OGUZ H. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. Br Poult Sci 2005; 46 (3): 394-400.
69. KENDALL MD. Avian thymus glands: A review. Dev Comp Immunol 1980; 4: 191-210.
70. KLIS FM, BOORSMA A, DE GROOT PWJ. Cell Wall Construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 2006. 23(3): 185-202.

71. KOCHER A, DENEV S, NIKIFOROV IP, DINEV I, SCHEIDEMANN C. Effects of Mannanligosaccharides (Bio-Mos) on composition of the caecal microflora and performance of broiler chickens. In proceeding of: BOKU Symposium Tierernährung 2005; 216-220.
72. LARSEN TO, SVENDSEN A, SMEDSGAARD J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (8):3630–3635.
73. LEE S, LILLEHOJ HS, PARK DW, HONG YH, LIN JJ. Effects of *Pediococcus* and *Saccharomyces* based probiotic (MitoMax®) on coccidiosis in broiler chickens. *Comparat Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; 30:261-268.
74. LEESON S, DIAZ GJ, SUMMERS JD. Ochratoxins. In: *Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins*. University Books. Guelph, Canada. 1995.
75. LI S, MARQUARDT RR, FROHLICH AA, VITTI TG, CROW G. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 145: 82-90.
76. LILLEHOJ EB. Aflatoxin: genetic mobilization agent. En *Mycotoxins in Ecological Systems*. Bhatnagar D *et al.*, editores. Marcel Dekker, New York. 1992: 1-22.
77. LILLEHOJ EB. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: Smith JE, Henderson RS, eds. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Ratón. 1991:1-35.
78. MAGNOLI AP, MONGE MP, MIAZZO RD, CAVAGLIERI LR, MAGNOLI CE, MERKIS CI, CRISTOFOLINI AL, DALCERO AM, CHIACCHIERA SM. Effect of low levels of aflatoxin B1 on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. *Poult Sci* 2011; 90:48-58.
79. MALLMANN CA, DILKIN P, GIACOMINI LZ, RAUBER RH, PEREIRA CE. Micotoxinas en ingredientes para alimento balanceado de aves. *Memorias*

- del XX Congreso Latinoamericano de Avicultura. Porto Alegre, Brasil 2007. p. 191-204.
80. MARIANI GVC. Desempenho produtivo de frangos de corte submetido à intoxicação experimental com aflatoxinas em diferentes idades. Santa Maria, 1998. 79f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Santa Maria, 1998.
 81. MARQUARDT RR, FROHLICH AA. A review of recent advances in understanding ochratoxycosis. *J Anim Sci* 1992; 70 (12):3968-3988.
 82. MEHDI A, HASAN G. Immune response of broiler chicks fed yeast derived mannan oligosaccharides and humate against Newcastle disease. *Appl Sci J* 2012; 18 (6): 779- 785.
 83. MISHRA HN, DAS C. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Rev in Food Sci and Nutr* 2003; 43 (3): 245-264.
 84. MOHAMED MA, HASSAN HMA, EL-BARKOUKY. Effect of mannan oligosaccharide on performance and carcass characteristics of broiler chicks. *J Agr Soc Sci* 2008; 4:13-17.
 85. MORENO ME, GUTIÉRREZ MG. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de Aflatoxinas. Primera edición. UNAM, México D. F., 1992:1-15.
 86. MOURA MA, MACHADO CH, PORFIRIO LC, FREIRE RB. Effects of ochratoxin A on broiler leukocytes. *Bra J Poult Sci* 2004; 6(8):187-190.
 87. MUIR WI, BRYDEN WL, HUSBAND AJ. Investigation of the site of precursors for IgA-producing cells in the chicken intestine. *Immunol Cell Biol* 2000; 78:294–296.
 88. NAGY N, IGYARTO B, MAGYAR A, GAZDA E, PALYA V, OLAH I. Oesophageal tonsil of the chicken. *Acta Vet Hung* 2005; 53:173-178.
 89. NGUYEN TH, FLEET GH, ROGERS PL. Composition of the cell wall of several yeast species. *App. Microbiol Biotechnol* 1998; 50: 206-212.
 90. O'BRIEN E, DIETRICH DR. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit Rev Toxicol* 2005; 35: 33-60.

91. OLAH I, GLICK B, TAYLOR RL JR. Meckel's diverticulum. II. A novel lymphoepithelial organ in the chicken. *Anat Rec* 1984; 208 (2): 253-263.
92. OLAH I, GLICK B. Meckel's diverticulum I. Extramedullary myelopoiesis in yolk sac of hatched chickens (*Gallus domesticus*). *Anat. Rec* 1984; 208 (2): 243 -252.
93. OLAH I, NAGY N, MAGYAR A, PALYA V. Esophageal tonsil: a novel gut-associated lymphoid organ. *Poult Sci* 2003; 5:767-570.
94. OLAH I, VERVELDE L. Structure of the avian lymphoid system. In: *Avian Immunology 2008*. Academic Press Elsevier. United Kingdom, p. 13-50.
95. OSBORN HMI, KHAN T. *Oligosaccharides: their synthesis and biological roles*. Oxford University Press, 2000.
96. PARDO E, MARÍN S, RAMOS AJ, SANCHIS V. Effect of water activity and temperature on mycelial growth and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* on irradiated green coffee beans. *J Food Prot* 2005; 68(1): 133-138.
97. PATTERSON JA, BURKHOLDER KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci* 2003; 82:627-631.
98. PAYNE LN. The lymphoid system. In: *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl* (eds D.J. Bell and B.M. Freeman), Academic Press, London. 1971:985-1037.
99. PITT JI. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53 (2): 266-269.
100. RAJU MVLN, DEVEGOWDA G. Esterified glucomannan in broiler chicken diets contaminated with aflatoxina, ochratoxin and T-2 toxin: evaluation of its binding ability (in vitro) and efficacy as immunomodulatory. *Aust J Anim Sci* 2002; 15 (7):1051-1056.
101. RILEY RT, PESTKA J. Mycotoxins: metabolism, mechanisms and biochemical markers. In: *The Mycotoxin Blue Book 2005*, Nottingham University Press England, p. 279-294.

102. RINGOT D, LERZY B, BONHOURE JP, AUCLAIR E, ORIOL E, LARONDELLE Y. Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochem* 2005; 40: 3008-3016.
103. ROSEN GD, Halo-analysis of the effects of genetic, managemental, chronological and dietary variables on the efficacy of a pronutrient mannanoligosaccharide in broilers. *Brit Poult Sci* 2005; 1:27-29.
104. RUSTOM IYS. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem* 1997; 9(1): 57-67.
105. SAKHARE PS, HARNE SD, KALOREY DR, WARKE SR, BHANDARKAR AG, KURKURE NV. Effect of Toxiroak polyherbal feed supplement during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxicoses in broilers. *Vet Arhiv* 2007; 77 (2): 129-146.
106. SANTIN E, MAIORKA A, MACARI M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Appl Poult Res* 2001; 10: 236-244.
107. SANTIN E, PAULILLO AC, MAIORKA A, ALESSI CA, EVERTON L. The effects of ochratoxin/aluminosilicate interaction on the tissues and humoral immune response of broilers. *A Path* 2002; 31: 73-79.
108. SANTIN E, PAULILLO AC, MAIORKA A, OKADA LSN, MACARI M, FISCHER DA SAV, ALESSI AC. Evaluation of the efficacy *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Int J Poult Sci* 2003a; 2 (5): 341-344.
109. SANTIN E, PAULILLO AC, NAKAGUI LSO, ALESSI AC, POLVEIRO WJC, MAIORKA A. Evaluation of cell wall yeast as adsorbent of ochratoxin in broilers diets. *Int J Poult Sci* 2003b; 2 (6): 465-468.
110. SANTIN E, PAULILLO AC, NAKAGUI LSO, ALESSI AC, MAIORKA A. Evaluation of yeast cell wall on the performance of broilers fed diets with or without mycotoxins. *Rev Bras Cienc Avic* 2006; 8 (4): 221-225.
111. SARGEANT K, CARRAGHAN RB, ALLCROFT R. Toxic products in groundnuts. Chemistry and origin. *Chem And Ind* 1963; 53-55.

- 112.SAWARKAR RA, SONKUSALE PM, KURKURE VN, JANGADE RC, MAINI S. Experimental aflatoxin and ochratoxin induced mixed mycotoxicosis in broilers and its amelioration with herbomineral toxin binder “toxiroak gold”. Int J Poult Sci 2011; 10 (7): 560-566.
- 113.SCHAT KA, MAYERS TJ. Avian Intestinal Immunity. Crit Rev Poult Biol 1991; 3:19-34.
- 114.SMITH JE, ROSS K. The toxigenic Aspergilli, in: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE and Henderson RS (eds). Boca Raton, Florida. CRC Press. 1991:101-118.
- 115.SOLIS SF, DONOGHUE AM, FARNELL MB, HUFF GR, HUFF WE, DONOGHUE DJ. Gastrointestinal maturation is accelerated in turkey poults supplemented with a mannan-oligosaccharide yeast extract (Alphamune). Poult Sci. 2007; 86:921:930.
- 116.SPRING P, WENK C, DAWSON KA, NEWMAN KE. The Effects of Dietary Mannanligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentrations of Enteric Bacteria in the Ceca of Salmonella-Challenged Broiler Chicks. Poult Sci 2000; 79: 205-211.
- 117.STANLEY VG, OJO R, WOLDESENBET S, HUTCHINSON DH, KUBENA LF. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. Poult Sci 1993; 70:1867-1872.
- 118.STANLEY VG, SEFTON AE, CHKWE H. The interaction of temperature, mannanligosaccharides and aflatoxin on broiler chicks. Proc. 10th World’s Poultry Science Assoc. Conf. On Poultr. Nutr. Antalya, Turkey. 1995:2-7.
- 119.STEYN PS, STANDER MA. Mycotoxins as causal factors of disease in humans. J Toxicol Toxin 1999; 18:229-243.
- 120.STOEV SD, ANGUELOV G, IVANOV I, PAVLOV. Influence of ochratoxin A and an extract of artichoke on the vaccinal immunity and health in broiler chicks. Exp Toxicol Pathol 2000; 52: 43-55.
- 121.SWANSON BG. Mycotoxins on fruits and vegetables. Acta Horticulturae 1987; 207: 49 -61.

122. SWENNEN K, COURTIN MC, DELCOUR JA. Non-digestible oligosaccharides with probiotic properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006; 46:459-469.
123. TEJADA CZI, ÁVILA GE, CASAUBON HM, CERVANTES OR, VASQUÉZ PC, HERNÁNDEZ BE, MORENO ME. Biodetoxification of Aflatoxin-contaminated chick feed. *Poult Sci* 2008; 87 (8):1569-1576.
124. TELEMO E, KOROTKOVA M, HANSON LA. Antigen presentation and processing in the intestinal mucosa a lymphocyte homing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 90:28-32.
125. TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ H, STĚPÁNKOVÁ R, KOZÁKOVÁ H, HUDCOVIC T, VANNUCCI L, TUČKOVÁ L, ROSSMANN P, HRNČÍŘ T, KVERKA M, ZÁKOSTELSKÁ Z, KLIMEŠOVÁ K, PŘIBYLOVÁ J, BÁRTOVÁ J, SANCHEZ D, FUNDOVÁ P, BOROVSÁKÁ D, SRŮTKOVÁ D, ZÍDEK Z, SCHWARZER M, DRASTICH P, FUNDA DP. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 2011; 8 (2) 110-120.
126. TSUKADA C, YOKOYAMA H, MIYAJI C, ISHIMOTO Y, KAWAMURA H, ABO T. Immunomodulation of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administration of β -glucan. *Cell. Immunol.* 2003; 221:1-5.
127. UNA. Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2014. Dirección de Estudios Económicos marzo 2014. Unión Nacional de Avicultores.
128. VAN DER MERWE KJ, STEYN PS, FOURIE L. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J Chem Soc* 1965; 5: 7083-7088.
129. VAN DORP DA, VAN DER ZIJDEN. Dihydro-aflatoxin B₁, metabolite of *A. flavus*. *Rec Trax Chem Des* 1963; 82: 587-592.
130. VERMA J, JOHRI TS, SWAIN BK, AMEENA S. Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers. *Br Poult Sci* 2004; 45: (4) 512-518.

131. WANG JS, SHEN X, HE X. Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 347–354.
132. WESTSTRATE JA, VAN POPPEL G, VERSCHUREN PM. Functional Foods, trends and future. *Br J Nutr* 2002; 88:233-235.
133. WYATT RD. Mycotoxin Interactions In: *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press. Nottingham, England. 2005: 269-278.
134. YIANNIKOURIS A, FRANCOIS J, POUGHON L, DUSSAP CG, BERTIN G, JEMINET G, JOUANY JP. Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Food Prot* 2004; 67: 1195-1200.
135. YIANNIKOURIS A, MORAN C. Mycotoxin Impact on Gastrointestinal Function: Use of the Sequestering Properties of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Glucans to Alleviate the Risk. *Memorias de la XXXIII Convención Annual ANECA*. 2008:129-130.
136. ZHANG AW, LEE BD, LEE KW, AN GH, SONG KB, LEE CH. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poult Sci*. 2005; 84: 1015-1021.
137. ZHONGEUM P, OTAKA K, MAOKA T, HIDAKA K. Structure of β -glucan oligomer from Laminarium and It's effect on Human Monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 553-558.
138. ZOU XT, QIA XJ, XU ZR. Effect of beta-mannanase (hemicell) on growth performance and immunity of broilers. *Poult Sci* 2006; 85: 2176-2179.

10. ANEXOS

Cuadro 1. Composición y análisis calculado de la dieta experimental de iniciación para pollo de engorda (1-21 días de edad)

Ingrediente	Dieta base kg (Testigo)
Sorgo	597.49
Pasta de soya	317.97
Aceite de soya	44.74
Fosfato monodivale	17.69
Carbonato de calcio	11.15
Sal	3.82
DL-Metionina 99%	2.69
L-Lisina HCl	1.50
Premezcla de vitaminas*	1.00
Cloruro de colina 60%	1.00
Premezcla de minerales**	0.50
Bacitracina	0.30
Antioxidante	0.15
Total	1000
	Análisis calculado
Energía metabolizable (Kcal/kg)	3150
Proteína	21.00
Lisina dig. (%)	1.10
Met + Cisdig. (%)	0.84
Calcio total (%)	0.90
Fósforo disponible (%)	0.45

* Mezcla de vitaminas que proporciona: Vit. A 12'000,000 UI; Vit. D₃ 2'500,000 UI; Vit. E 15,000 UI; Vit. K₃ 2,000 mg/kg; Vit. B₁ 2,250 mg/kg; Vit. B₂ 8,000 mg/kg; Vit. B₃ 45,000 mg/kg; B₁₂; Vit. B₅ 12,500 mg/kg; Vit. B₆ 3,500 mg/kg; Vit. B₁₂ 20 mg/kg; ácido fólico 1,500 mg/kg; biotina 25 mg/kg.

** Mezcla de minerales que proporciona: Selenio 200mg/kg; Cobalto 200mg/kg; Yodo 300mg/kg; Cobre 12,000mg/kg; Zinc 50,000mg/kg; Hierro 50,000mg/kg; Manganeso 110,000mg/kg.

**Cuadro 2. Peso inicial, semanal y final
de las aves durante las 3 semanas del estudio**

Tratamiento	Día 1	Sem. 1	Sem. 2	Sem. 3
Testigo	45.63±0.51 ^a	166.73±1.65 ^a	420.67±3.58 ^{ab}	814.52±12.10 ^{ab}
AFB	45.87±0.43 ^a	165.97±2.75 ^a	410.30±4.02 ^{ab}	799.84±8.22 ^b
OTA	45.90±0.64 ^a	164.07±2.32 ^a	408.97±5.11 ^{ab}	804.72±6.30 ^b
PCL	45.30±0.34 ^a	171.17±1.88 ^a	428.40±3.08 ^a	844.48±7.63 ^a
AFB+OTA	45.90±0.17 ^a	162.67±2.16 ^a	405.33±3.24 ^b	795.30±6.12 ^b
AFB+PCL	45.33±0.13 ^a	169.53±2.28 ^a	427.80±2.83 ^a	845.17±11.01 ^a
OTA+PCL	45.47±0.26 ^a	164.83±2.25 ^a	423.30±5.76 ^{ab}	834.08±8.79 ^{ab}
AFB+OTA+PCL	46.07±0.63 ^a	163.57±1.44 ^a	415.87±4.88 ^{ab}	813.17±10.81 ^{ab}

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05)

Cuadro 3. Ganancia diaria de peso por semana y final de las aves durante las 3 semanas del estudio

Tratamiento	Sem. 1 (g)	Sem. 2 (g)	Sem. 3 (g)	Final (g)
Testigo	17.33±0.18 ^a	36.30±0.45 ^{ab}	56.27±1.51 ^a	36.62±0.57 ^{ab}
AFB	17.13±0.40 ^a	34.90±0.17 ^{ab}	55.63±0.59 ^a	35.90±0.39 ^b
OTA	16.87±0.39 ^a	35.00±0.40 ^{ab}	56.53±0.70 ^a	36.14±0.30 ^b
PCL	17.97±0.23 ^a	36.77±0.66 ^{ab}	59.43±0.99 ^a	38.06±0.36 ^a
AFB+OTA	16.67±0.35 ^a	34.67±0.17 ^b	55.70±1.34 ^a	35.69±0.29 ^b
AFB+PCL	17.77±0.34 ^a	36.87±0.14 ^a	59.60±1.45 ^a	38.09±0.52 ^a
OTA+PCL	17.03±0.31 ^a	36.90±0.68 ^a	58.70±2.08 ^a	37.55±0.41 ^{ab}
AFB+OTA+PCL	16.77±0.18 ^a	36.07±0.49 ^{ab}	56.80±1.68 ^a	36.53±0.51 ^{ab}

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05)

Cuadro 4. Consumo de alimento semanal y final de las aves durante las 3 semanas del estudio

Tratamiento	Sem.1 (g)	Sem. 2 (g)	Sem. 3 (g)	Consumo final (g)
Testigo	135.71±3.30 ^a	334.99±2.87 ^a	554.41±3.90 ^{ab}	1025.11±6.70 ^{ab}
AFB	137.00±4.51 ^a	334.90±3.24 ^a	547.37±2.15 ^{ab}	1019.27±5.53 ^{ab}
OTA	130.49±1.82 ^a	329.76±0.70 ^a	546.18±2.03 ^{ab}	1006.43±4.33 ^{ab}
PCL	137.63±1.83 ^a	335.05±1.41 ^a	554.67±6.64 ^{ab}	1027.34±12.88 ^{ab}
AFB+OTA	130.25±1.39 ^a	326.50±1.86 ^a	536.16±2.51 ^b	992.91±4.50 ^b
AFB+PCL	140.61±2.21 ^a	340.72±4.29 ^a	562.88±3.26 ^a	1044.36±15.07 ^a
OTA+PCL	139.72±2.48 ^a	341.39±4.42 ^a	561.19±4.12 ^a	1042.30±5.77 ^a
AFB+OTA+PCL	136.25±2.60 ^a	330.61±2.82 ^a	542.29±2.36 ^{ab}	1009.15±5.39 ^{ab}

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05)

**Cuadro 5. Conversión alimenticia (CA)
de las aves al final del estudio
(3 semanas de edad)**

Tratamiento	CA
Testigo	1.258±0.017 ^a
AFB	1.274±0.004 ^a
OTA	1.251±0.006 ^a
PCL	1.216±0.009 ^a
AFB+OTA	1.249±0.011 ^a
AFB+PCL	1.235±0.015 ^a
OTA+PCL	1.250±0.013 ^a
AFB+OTA+PCL	1.240±0.016 ^a

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05)

Cuadro 6. Títulos de anticuerpos obtenidos contra la enfermedad de Newcastle (ENC) mediante la prueba de IH en aves de 8 y 22 días de edad

Tratamiento	Título log2 8 días	Título log2 22 días
Testigo	4.13±0.227 ^a	8.75±0.412 ^a
AFB	4.38±0.183 ^a	8.38±0.420 ^a
OTA	4.00±0.267 ^a	8.00±0.327 ^a
PCL	4.13±0.295 ^a	9.38±0.498 ^a
AFB+OTA	4.25±0.250 ^a	8.50±0.535 ^a
AFB+PCL	4.00±0.267 ^a	9.38±0.498 ^a
OTA+PCL	4.0±0.327 ^a	9.50±0.327 ^a
AFB+OTA+PCL	4.13±0.295 ^a	9.38±0.653 ^a

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05)

Cuadro 7. Resultados obtenidos en el hemograma en aves de 3 semanas de edad

Tratamiento	Ht (L/L)	Eritroc. (10 ¹² /L)	PP (g/L)	Leuc. (10 ⁹ /L)	Heter. (10 ⁹ /L)	Linfoc. (10 ⁹ /L)	Monoc. (10 ⁹ /L)	Basof. (10 ⁹ /L)	Eosin. (10 ⁹ /L)	Tromb. (10 ⁹ /L)
Testigo	0.32±0.014 ^a	3.01±0.05 ^a	34.67±2.40 ^a	7.81±0.30 ^{ab}	3.35±0.44 ^{ab}	3.25±0.16 ^{ab}	0.67±0.04 ^a	0.46±0.02 ^a	0.07±0.03 ^a	10.67±0.72 ^a
AFB	0.34±0.013 ^a	2.96±0.17 ^a	32.00±2.00 ^a	7.21±0.11 ^{bc}	3.13±0.09 ^{ab}	3.07±0.14 ^b	0.53±0.03 ^a	0.39±0.03 ^a	0.08±0.02 ^a	11.00±0.32 ^a
OTA	0.33±0.003 ^a	3.00±0.31 ^a	31.33±1.76 ^a	6.82±0.26 ^c	2.60±0.15 ^b	3.06±0.13 ^b	0.52±0.05 ^a	0.48±0.08 ^a	0.15±0.04 ^a	10.60±0.41 ^a
PCL	0.31±0.010 ^a	3.12±0.06 ^a	37.33±0.67 ^a	8.57±0.04 ^a	3.64±0.06 ^a	3.69±0.11 ^a	0.67±0.09 ^a	0.47±0.04 ^a	0.10±0.03 ^a	12.23±1.58 ^a
AFB+OTA	0.30±0.012 ^a	2.92±0.08 ^a	30.00±1.16 ^a	6.75±0.05 ^c	2.58±0.07 ^b	3.05±0.09 ^b	0.51±0.03 ^a	0.46±0.05 ^a	0.15±0.01 ^a	13.70±0.26 ^a
AFB+PCL	0.33±0.020 ^a	3.10±0.05 ^a	35.33±1.76 ^a	8.26±0.10 ^a	3.67±0.19 ^a	3.32±0.07 ^{ab}	0.69±0.06 ^a	0.48±0.02 ^a	0.10±0.01 ^a	12.13±0.61 ^a
OTA+PCL	0.31±0.018 ^a	3.07±0.06 ^a	33.33±1.33 ^a	8.17±0.18 ^a	3.65±0.10 ^a	3.22±0.09 ^{ab}	0.70±0.05 ^a	0.48±0.14 ^a	0.12±0.04 ^a	10.57±0.49 ^a
AFB+OTA+PCL	0.31±0.013 ^a	3.03±0.08 ^a	32.00±1.16 ^a	7.28±0.04 ^{bc}	3.01±0.06 ^{ab}	3.08±0.08 ^b	0.58±0.06 ^a	0.45±0.03 ^a	0.15±0.01 ^a	12.93±0.40 ^a

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05)

Ht: hematocrito
Eritroc: eritrocitos totales
PP: proteínas plasmáticas
Leuc: leucocitos totales
Heter: heterófilos
Linfoc: linfocitos
Monoc: monocitos
Basof: basófilos
Eosin: eosinófilos
Tromb: trombocitos

Cuadro 8. Cantidad de IgA en contenido intestinal obtenida mediante la prueba de ELISA (ng/ml) en aves de 3 semanas de edad

Tratamiento	Cantidad de IgA (ng/ml)
Testigo	216.5±10.43 ^{abc}
AFB	198.2±4.17 ^c
OTA	205.6±3.25 ^{bc}
PCL	235.4±4.76 ^a
AFB+OTA	193.5±7.75 ^c
AFB+PCL	233.8±20.34 ^a
OTA+PCL	231.1±11.08 ^{ab}
AFB+OTA+PCL	211.8±9.47 ^{abc}

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05)

Cuadro 9. Peso relativo de los órganos (% de peso corporal) en aves de 3 semanas de edad

Tratamiento	Bazo	Timo	Bolsa de Fabricio
Testigo	0.11±0.002 ^a	0.42±0.011 ^a	0.26±0.004 ^a
AFB	0.09±0.001 ^b	0.36±0.010 ^b	0.22±0.006 ^b
OTA	0.09±0.003 ^b	0.36±0.011 ^b	0.22±0.006 ^b
PCL	0.11±0.001 ^a	0.43±0.005 ^a	0.27±0.007 ^a
AFB+OTA	0.09±0.004 ^b	0.36±0.007 ^b	0.21±0.002 ^b
AFB+PCL	0.10±0.002 ^{ab}	0.38±0.008 ^{ab}	0.27±0.003 ^a
OTA+PCL	0.10±0.002 ^{ab}	0.38±0.007 ^{ab}	0.28±0.007 ^a
AFB+OTA+PCL	0.10±0.004 ^{ab}	0.38±0.017 ^{ab}	0.28±0.008 ^a

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05)

**Cuadro 10. Respuesta de hipersensibilidad tardía.
Incremento del grosor de la piel de la pata izquierda
(24 horas post-inoculación) en aves de 3 días de edad**

Tratamiento	Incremento del grosor de la membrana interdigital de la pata izquierda (mm)
Testigo	0.47±0.056 ^{abc}
AFB	0.39±0.028 ^{bc}
OTA	0.37±0.020 ^{bc}
PCL	0.62±0.052 ^a
AFB+OTA	0.30±0.029 ^c
AFB+PCL	0.50±0.026 ^{ab}
OTA+PCL	0.50±0.038 ^{ab}
AFB+OTA+PCL	0.47±0.055 ^{abc}

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (P<0.05)

FIGURAS

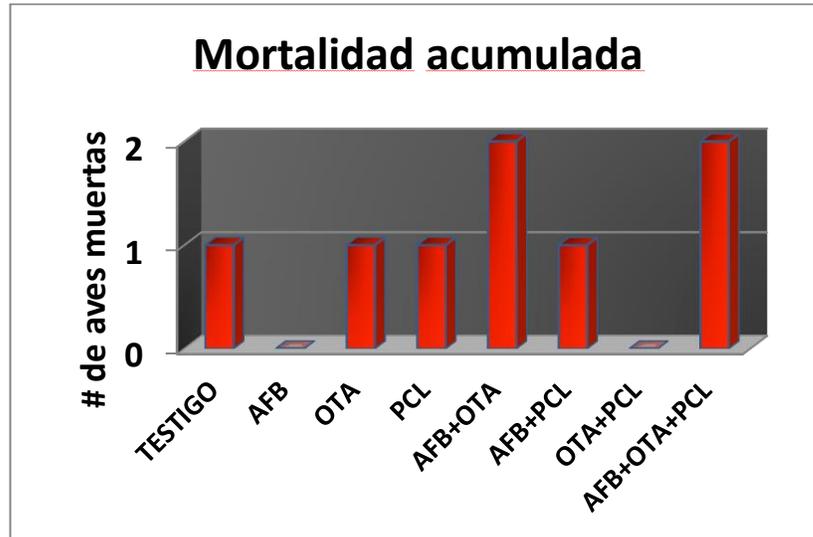


Figura 5. Mortalidad acumulada por tratamiento de las aves a los 21 días de edad.

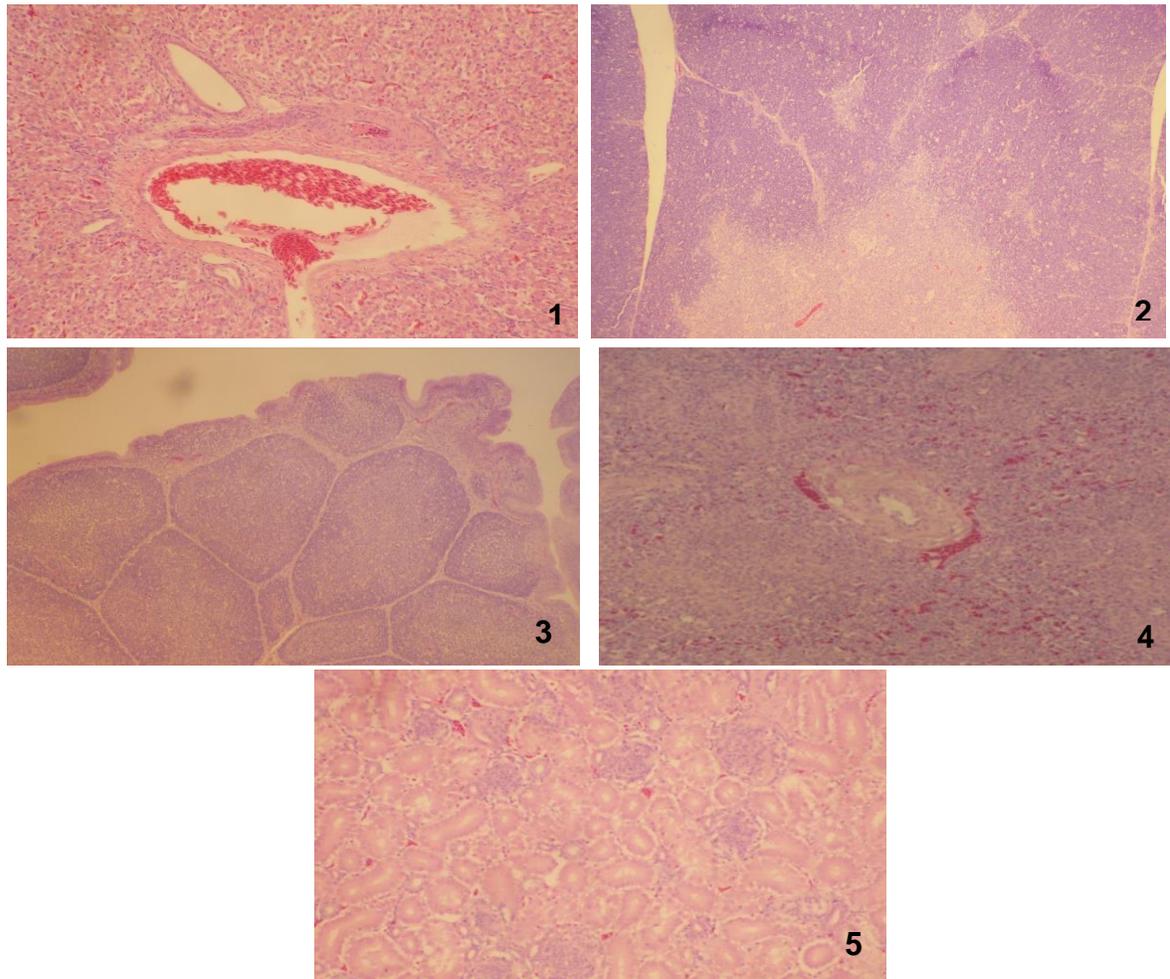


Figura 6. Cortes histológicos de los tratamientos Testigo y PCL. En donde no se observan lesiones. 1) hígado, 2) timo, 3) BF, 4) bazo y 5) riñón.

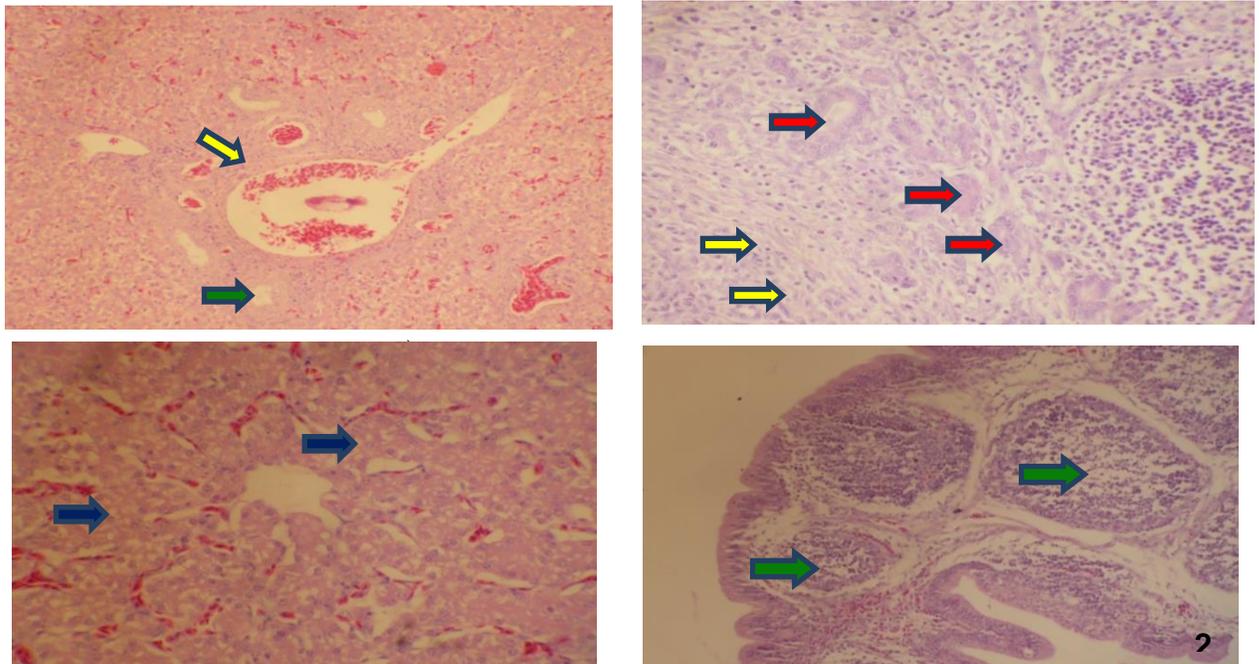


Figura 7. Cortes histológicos del tratamiento AFB. En hígado se observa fibrosis (flecha amarilla), hiperplasia de conductos biliares (flechas rojas) y degeneración grasa (flechas azules), 2) BF con depleción linfóide (flechas verdes).

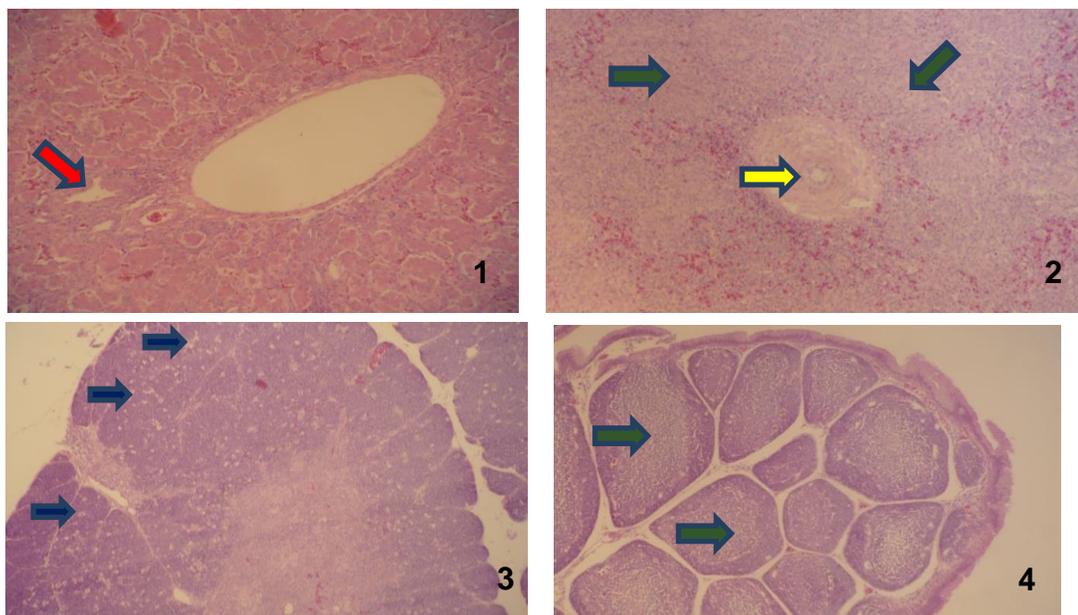


Figura 8. Cortes histológicos del tratamiento OTA. 1) hígado (SCPA), 2) bazo se observa depleción linfóide leve (flechas verdes), 3) timo, se observa apoptosis (flechas azules), 4) BF, se observa depleción linfóide (flechas verdes).

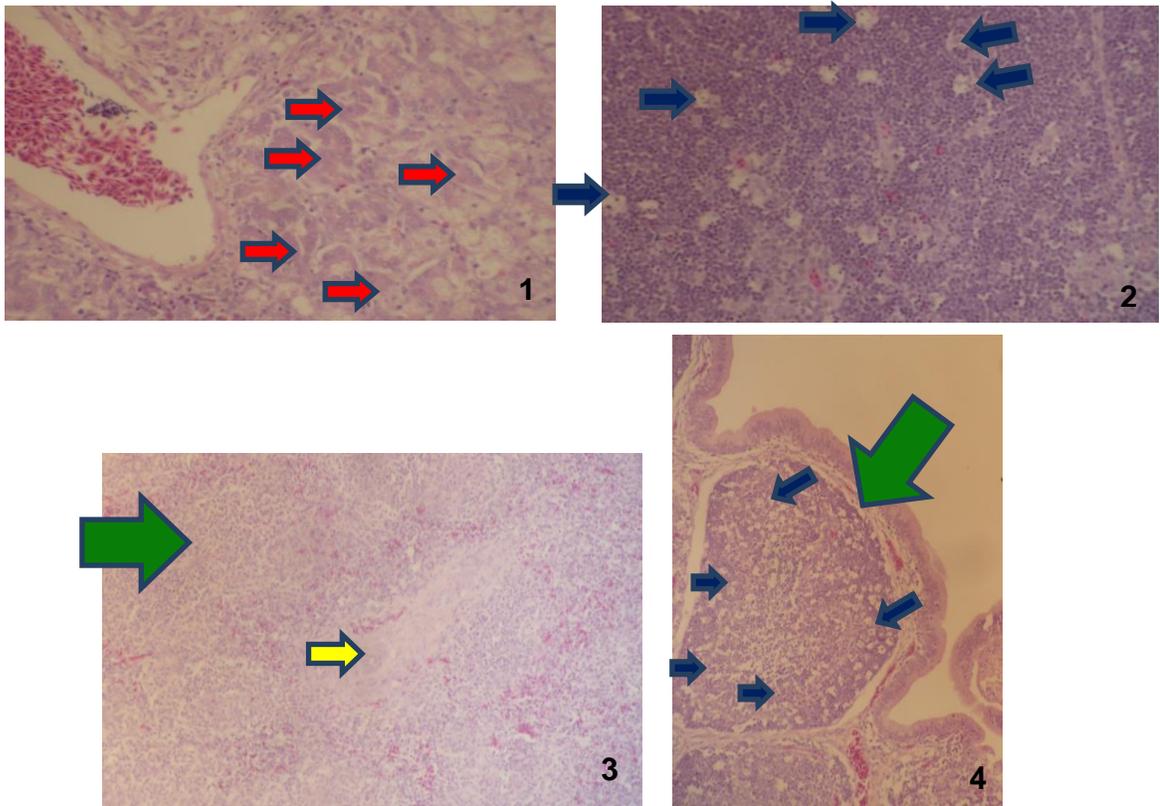


Figura 9. Cortes histológicos del tratamiento AFB+OTA. 1) hígado con hiperplasia de conductos biliares (flechas rojas), 2) timo con apoptosis (flechas azules), 3) bazo con depleción linfoide (flecha verde), 4) BF con depleción linfoide (flecha verde) y apoptosis (flechas azules).

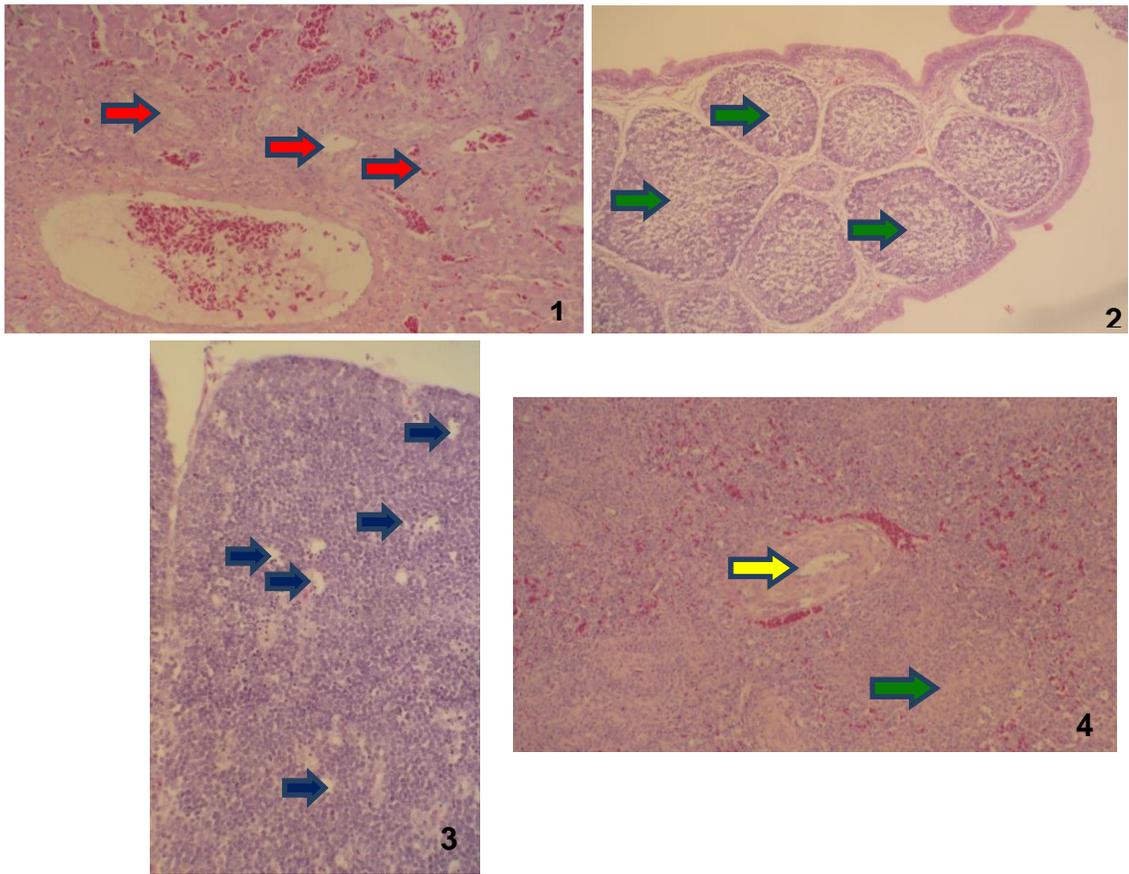


Figura 10. Cortes histológicos del tratamiento AFB+OTA+PCL, 1) hígado con hiperplasia de conductos biliares (flechas rojas), 2) BF con depleción linfoide (flechas verdes), 3) timo con depleción linfoide y apoptosis (flechas azules), 4) bazo con depleción linfoide (flecha verde).

Método AflaTest B de Vicam Corp (1999)

1. Se pesaron 50 g de la muestra junto con 5 g de sal (NaCl) y se colocaron en un vaso de licuadora.
2. Se agregaron 100 ml de una solución metanol-agua (80:20) al vaso.
3. Se mezcló el contenido en la licuadora por 1 minuto.
4. Se pasó el contenido obtenido por papel filtro y se colectó en un vaso de precipitado para obtener un filtrado de la muestra.
5. Se colocaron 10 ml del filtrado en otro vaso con 40 ml de agua purificada y se mezclaron bien para obtener un extracto.
6. Se tomaron 2 ml del extracto y se pasaron a través de la columna de inmunoafinidad AflaTest a una velocidad de 1-2 gotas por segundo.
7. Posteriormente se pasaron 5 ml de agua purificada a través de la columna de inmunoafinidad a una velocidad de 2 gotas por segundo.
8. Se pasó 1 ml de HPLC grado metanol a través de la columna a una velocidad de 1-2 gotas por segundo y se colectó todo el líquido (1 ml) en un tubo de ensaye pequeño, esta fue la muestra final a analizar.
9. Se agregó 1 ml de revelador Aflatest a la muestra y se mezcló con un vortex.
10. Se colocó la muestra en el fluorometro, el cual estaba previamente calibrado para AFB1 y se tomó la lectura de la concentración de AFB1 en la muestra, después de 60 segundos.

Método Ochratest de Vicam Corp (1999)

1. Se pesaron 50 g de muestra junto con 5 g de sal (NaCl) y se colocaron en un vaso de licuadora.
2. Se agregaron 100 ml de una solución metanol-agua (80:20) al vaso.
3. Se mezcló el contenido en la licuadora por 1 minuto.
4. Se pasó el contenido obtenido por papel filtro y el líquido filtrado se colectó en un vaso de precipitado.
5. Se colocaron 10 ml del filtrado en otro vaso con 40 ml de agua purificada y se mezclaron bien para obtener un extracto.
6. Se tomaron 2 ml del extracto y se pasaron a través de la columna de inmunoafinidad OchraTest a una velocidad de 1-2 gotas por segundo.
7. Posteriormente se pasaron 5 ml de solución buffer para micotoxinas a través de la columna de inmunoafinidad a una velocidad de 1-2 gotas por segundo.
8. Se pasaron 5 ml de agua purificada a través de la columna a una velocidad de 1-2 gotas por segundo.
9. Se pasó 1.5 ml de Ochratest solución de elución a través de la columna a una velocidad de 1 gota por segundo y se colectó todo el líquido (1.5 ml) en un tubo de ensaye pequeño, esta fue la muestra final a analizar, la cual se mezcló en un vórtex.
10. Se colocó la muestra en el fluorometro, el cual estaba previamente calibrado para OTA y se tomó la lectura de la concentración de OTA en la muestra, después de 60 segundos.