



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD
ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

USO DE PAREDES CELULARES DE *Saccharomyces cerevisiae* (PCL) EN EL
MANTENIMIENTO DE LA SALUD, INTEGRIDAD E INMUNIDAD EN PRESENCIA
DE **AFLATOXINA B1 Y B2** EN EL ALIMENTO DEL POLLO DE ENGORDA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

JUAN OMAR HERNÁNDEZ RAMÍREZ

TUTOR

DR. ERNESTO MORENO MARTÍNEZ (FES CUAUTITLÁN UNAM)



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.

INDICE

Apartado CI	asificación	Pagina
1.0	Índice	2
1.1	Resumen	4
1.1	Introducción	7
1.2	Características generales que deben conservar los granos	11
1.3	Características para que los hongos con capacidad toxigénica se desarrollen y produzcan micotoxinas	15
1.3.1	Factores físicos	15
1.3.2	Factores químicos	18
1.3.3	Factores biológicos	20
1.4	Clasificación taxonómica de <i>aspergillus</i>	21
1.4.1	Características morfológicas generales del genero <i>aspergillus</i>	22
1.4.2	Crecimiento de <i>aspergillus</i>	22
1.5	Micotoxinas	24
1.5.1	Historia de las micotoxinas	24
1.5.2	Generalidades de las Micotoxinas	25
1.5.3	Interacciones Micotoxinas Nutrientes en la digestión	26
1.6	Aflatoxinas	29
1.6.1	Biosíntesis de aflatoxina	30
1.6.2	Unión de la aflatoxina al ADN dando origen a la formación de aductos	33
1.7	Aflatoxicosis aviar	35
1.7.1	Efectos biológicos de las aflatoxinas	34
1.7.2	Dosis para presentación de enfermedad	37
1.7.3	Efectos sobre aves de engorda	36
1.7.3.1	Signos clínicos	39
1.7.3.2	Morfopatología	40
1.7.3.3	Hematología y química sanguínea	40
1.8	Aflatoxinas y respuesta inmune	42
1.8.1	Prevención	44
1.8.2	Probióticos	45
1.8.3	Prebióticos	47
1.9	Las levaduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y sus aplicaciones en la alimentación animal	49
1.9.1	Tipos de fabricación de levaduras	50
1.9.2	Características de los extracto de levadura	52
1.9.3	Pared celular	52
1.9.4	Utilización de levaduras en alimentación animal	54
1.9.5	Utilización de paredes celulares de levadura, mos y β -glucanos en alimentación animal	56
1.9.6	Principales ventajas y desventajas del empleo de fracciones de PCL	57
1.10	Exclusión de patógenos	59
1.10.1	Exclusión de bacterias fimbria-1 específicas	59
1.10.2	Absorción de micotoxinas	60

1.11	Pigmentos	62
2.0	Justificación	63
3.0	Hipótesis	63
4.0	Objetivo general	64
4.1	Objetivos particulares	64
5.0	Materiales y métodos	65
5.1	Producción de aflatoxinas	65
5.2	Paredes celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
5.3	Caseta de producción avícola	67
5.4	Variables productivas	69
5.5	Vacunación	70
5.6	Toma de muestras de sangre y suero	71
5.6.1	Materiales	71
5.6.2	Método	71
5.7	Determinación de títulos de anticuerpos	73
5.7.1	Materiales	73
5.7.2	Método	73
5.8	Necropsia	75
5.8.1	Material	75
5.8.2	Método	75
5.9	Evaluación histológica	76
5.9.1	Material	76
5.9.2	Método	77
5.10	Hipersensibilidad cutánea	77
5.10.1	Material	78
5.10.2	Método	78
5.11	Bioquímica sanguínea	79
5.11.1	Material	79
5.11.2	Métodos	79
5.11.2.1	Respuesta enzimática	80
5.11.2.2	Concentración sérica de transaminasas	83
5.12	Análisis del pigmento	83
5.12.1	Material	84
5.12.1	Método	84
6.0	Análisis estadístico	85
7.0	Diseño experimental	86
8.0	Resultados	87
9.0	Conclusiones	114
10.0 A	nexo gráficos	116
11.0	Referencias	124

Uso de Paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL) en el mantenimiento de la salud, integridad e inmunidad en presencia de **Aflatoxina B1 y B2** en el alimento del pollo de engorda.

Hernandez RJ^a , Moreno ME^a

^aFacultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Unidad de Investigación en granos y semillas, UNIGRAS, Edo. Mex, México. mvzjohr@comunidad.unam.mx

La alimentación avícola comprende entre el 65 y el 70% del costo en una explotación, por lo que la calidad de la misma constituye un factor de suma importancia para los alimentos procesados. Factores como los hongos y sus micotoxinas, deterioran la calidad de granos con los que se formulan los alimentos balanceados, dentro de las toxinas más importantes se encuentra la Aflatoxina B1 (**AFB1**); los investigadores conocen las diversas repercusiones físicas y económicas que causan estas toxinas en la producción animal, es por ello que se han dado a la tarea de buscar diferentes estrategias para la detoxificación de piensos, ya sea por métodos físicos, químicos y/o biológicos, ejemplo de este último son los fragmentos de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (**PCL**), bajo este esquema se ha innovado en el uso **PCL**, como alimento funcional los cuales han demostrado beneficios importantes en diferentes sitios del organismo del ave aunque primordialmente intestino.

Hipótesis: "El uso de prebiótico (PCL) en 2 contenidos en la alimentación de aves de engorda reducirá considerablemente los efectos negativos sobre las variables productivas como son: peso vivo, consumo de alimento y conversión alimenticia; así mismo mantendrá una integridad intestinal sana y disminuirá los efectos negativos provocados por AFB1 en 3 contenidos diferentes, en órganos como son: bazo, bolsa de cloaca hígado, riñón, así mismo, disminuirá las secuelas vasculares: bioquímica sanguínea, variables hemáticas, respuesta vacunal sérica contra la enfermedad de Newcastle."

El Análisis estadístico de las variables productivas, hematológicas y bioquímica, son conforme a un diseño completamente al azar, realizando la comparación de medias a través de la prueba de LDS. Los datos se analizaron utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion 16.0 Plus, las variable órganos se analizó con una prueba no paramétrica de Kruskal wallis en ambos casos con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Materiales y Métodos: La producción de aflatoxinas se realizó utilizando cepas de *Aspergillus flavus*^{1,2} productoras principalmente de AFB1 mezclado en alimento a en contenidos de 100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, se utilizó como prebiótico PCL 0.5 y 1.0 Kg/Ton. En las muestras sanguíneas se evaluó el hematocrito, la concentración sérica de transaminasas (ALT/GPT, FAS, AST/GOT, LDH) así como proteínas sanguíneas (totales y albúmina).³ La Titulación de anticuerpos vacúnales se hizo utilizando la pruebas de inhibición de la hemoaglutinación.^{4,5} El diseño experimental se distribuyó de la siguiente manera: 12 tratamientos con 3 repeticiones y 10 aves por tratamiento, se utilizaron aves de engorda de un día de vida, línea Ross 308 sin sexar, (PCL 0.0, 0.5 y 1.0 Kg/Ton, AFB 0.0, 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y mezclas entre PCL y AFB).

Resultados: El uso de PCL en concentraciones de 0.5 Kg/Ton resultó ser la más eficaz en los parámetros productivos se refiere, principalmente: peso vivo, ganancia de peso e índice de conversión ($p < 0.05$); las pruebas inmunológicas demuestran que utilizando PCL en concentraciones 0.5 Kg/Ton, resultó ser la más eficiente como aditivo en el alimento mejora la respuesta vacunal en contra de la enfermedad de Newcastle ($p < 0.05$); las pruebas para transaminasas hepáticas, así como peso porcentual de hígado, riñón, bolsa cloacal y bazo, demuestran que el uso de PCL concentración de 0.5 y 1.0 Kg/Ton ayudan a contrarrestar los efectos de la AFB1 ($p < 0.05$). En general se puede decir que las secuelas dejadas por la AFB1 son menores en los grupos con PCL (0.5 y 1.0 Kg/Ton) $p < 0.05$. Las otras pruebas realizadas durante el experimento no muestran diferencia estadística $p > 0.05$.

Conclusiones: La utilización de PCL en concentraciones de 0.5 y 1.0 kg/Ton. en el alimento del pollo de engorda redujo significativamente los efectos tóxicos para las variables productivas (peso vivo, consumo de alimento, conversión alimenticia, peso porcentual de hígado, riñón, bazo y bolsa cloacal; así como transaminasas ALT/GPT, FAS, AST/GOT, LDH y prueba de microplaca HI) cuando el alimento estaba contaminado con AFB en concentraciones de 100 o 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. De ambas concentraciones de PCL, el tratamiento con mejores resultados en general fue PCL 0.5

Kg/Ton. También se observó que los tratamientos con AFB 300 µg/kg no fueron beneficiados con ninguna concentración de PCL (0.5 y 1.0 Kg/Ton).

1Peña et al. 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. Ciencia y Desarrollo. Vol. 16. pp. 61-72.

2Betina, V. 1989. Biological aspects of micotoxinas. Chap.3 Chemical, Biological and Environmental Aspects.

3Elsiever.. p. 42, 50, 52, 101, 433.

4Quezada. et, al. 2000. Effects of aflatoxin B1 on the liver and kidney of broiler chickens during development.

5Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 125. pp 265-272.

Using *Saccharomyces cerevisiae* Cell Walls (PCL) in Health Maintenance , Integrity and Immunity in the Presence of aflatoxin B1 and B2 in the Food broiler .

Hernandez RJ^a , Moreno ME^a

^aFacultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Unidad de Investigación en granos y semillas, UNIGRAS, Edo. Mex, México. mvzjohr@comunidad.unam.mx

The poultry feed comprises between 65 and 70% of the cost on a farm, so the quality of it is of paramount importance for processed food. Factors such as fungi and their mycotoxins impair grain quality with balanced meals that within the major toxin is aflatoxin B1 (AFB1) are formulated; researchers know the various physical and economic impacts caused by these toxins in animal production, is why we have given the task of finding different strategies for detoxification of feed, either by physical, chemical and / or biological methods, Examples of the latter are cell wall fragments of *Saccharomyces cerevisiae* (PCL) under this scheme has been innovated in the use PCL as a functional food which has shown significant benefits in different parts of the body of the bird but primarily intestine.

Hypothesis: "The use of prebiotic (PCL) 2 concentrations in the feed of broilers significantly reduce the negative effects on the production variables such as: live weight, feed intake and feed conversion; likewise maintain a healthy intestinal integrity and reduce the negative effects caused by AFB1 in 3 different content in organs such as: spleen, bursa liver sewage, kidney, likewise, decrease vascular sequelae: blood chemistry, blood variables, response vaccine serum against Newcastle disease. "

The statistical analysis of production, hematological and biochemical variables are under a completely randomized design, making the comparison of means test through LDS. Data were analyzed using the statistical software Statgraphics Centurion 16.0 Plus, the variables analyzed organs with a nonparametric Kruskal wallis both with a significance level of $p < 0.05$.

Materials & Methods: The production of aflatoxins was performed using strains of *Aspergillus flavus*, mainly producing food for AFB1 mixed contents into 100, 200 and 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was used as prebiotic PCL 0.5 and 1.0 Kg/Ton. in blood samples hematocrit, serum transaminases (ALT/GPT, FAS, AST/GOT, LDH) and blood proteins (total and albumin) were evaluated. The Titration of vaccine antibody testing was done using the hemagglutination inhibition.

The experimental design was distributed as follows: 12 treatments with 3 replicates and 10 birds per treatment, broilers a day old, unsexed Ross 308 line (PCL 0.0, 0.5 and 1.0 Kg/Ton were used, AFB 0.0, 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and blends between PCL and AFB).

Results: Using PCL in concentrations of 0.5 Kg/Ton turned out to be the most effective in terms of production parameters, namely: live weight, weight gain and feed conversion ratio ($p < 0.05$); immunological evidence shows that at concentrations using PCL 0.5 Kg/Ton, was the most effective additive in feed improves vaccine response against Newcastle disease ($p < 0.05$); tests for liver transaminases and percentage weight of liver, kidney, and spleen bag sewer, show that the use of PCL concentration of 0.5 to 1.0 Kg/Ton help counteract the effects of AFB1 ($p < 0.05$). In general it can be said that the aftermath of AFB1 are lower in the groups with PCL (0.5 to 1.0 Kg/Ton) $p < 0.05$. The other tests performed during the experiment did not show statistical difference $P > 0.05$.

Conclusions: The use of PCL in concentrations of 0.5 and 1.0 Kg/Ton. in the feed of broilers significantly reduced the toxic effects production variables (body weight, feed intake, feed conversion, percentage weight of liver, kidney, spleen and cloacal pouch as well as transaminases ALT/GPT, FAS, AST/GOT, LDH and test microplate HI) where the food was contaminated with AFB at concentrations of 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. In both concentrations of PCL, the best overall results of PCL were 0.5 Kg/Ton. It was also observed that treatments with AFB 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ were not benefited by any PCL concentration (0.5 to 1 kg /Ton).

1Peña et al. 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. Ciencia y Desarrollo. Vol. 16. pp. 61-72.

2Betina, V. 1989. Biological aspects of micotoxinas. Chap.3 Chemical, Biological and Environmental Aspects.

3Elsiever.. p. 42, 50, 52, 101, 433.

4Quezada. et, al. 2000. Effects of aflatoxin B1 on the liver and kidney of broiler chickens during development.

5Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 125. pp 265-272.

1.1 INTRODUCCIÓN


En el entorno actual de nuestro México 2014 las actividades pecuarias al igual que las industriales mantienen un factor socioeconómico de gran importancia, bajo este cause la industria alimenticia se ha convertido en la punta de flecha para el sostenimiento de una macroeconomía que se dice al día de hoy ser un ejemplo de sustentabilidad, está a su vez apoyada por diferentes sectores que le proveen de todo lo necesario para la regulación de esta economía. La ganadería específicamente en lo referente al consumo de carne se encuentra catalogada como una de las actividades productivas con mayor auge en la última década y con proyecciones de interés para 2020¹.

El pollo tiene diversos ciclos de producción al año. En 2011 fueron sacrificados 1650 millones de aves y se proyecta que en 2020 sean 1800 millones de aves¹. En este periodo se espera que la producción en este año supere las 2.8 millones de toneladas mensuales (mtm) y en el largo plazo las 3.4 mtm. Además, derivado de los cambios en la dieta de los consumidores y de los precios relativos del pollo en comparación con los de la carne de cerdo y la de bovino, se espera que el consumo per cápita de pollo se incremente de 30 kg en 2011 a alrededor de 32 kg en 2020. Lo antes mencionado es derivado del incremento en la demanda, además que es la cadena pecuaria que mayor eficiencia presenta al convertir grano en carne.^{3,4}

Es importante resaltar que todo esto no se llevaría a cabo sin los insumos necesarios para el mantenimiento de esta importante industria, ya que dentro de esta se encuentran; costos variables y mantenimiento 30% y alimentación de los animales 70% del total de los egresos de una explotación². La producción de carnes en México se sustenta en diferentes ramas de la ganadería, dentro de las cuales sobresalen la bovina, la porcina y la avícola, que en conjunto aportan el 98% de la producción doméstica de productos cárnicos, el resto de las actividades destinadas a la producción de carne, como son la producción ovina, caprina, la de conejos y la de pavos, entre otros, mantienen una posición restringida e influenciada por los hábitos de consumo de la población, así también por

regiones establecidas de consumo de algunas de ellas en el territorio nacional y aunada a los precios fluctuantes de éstas. En el esquema del inventario alimentario (Cuadro 1), se puede apreciar la distribución nacional de especies animales más representativas para el consumo humano.^{3,4}

Cuadro 1.- Producción pecuaria por productos^{3,4}

Producción pecuaria		 SAGARPA	
PRODUCCIÓN PECUARIA POR PRODUCTOS (Toneladas)			
PRODUCTO	2009	2010	Var. %
GANADO EN PIE	4,923,235	5,080,804	3.2
BOVINO	3,212,508	3,333,473	3.8
PORCINO	1,519,411	1,550,896	2.1
OVINO	106,323	108,658	2.2
CAPRINO	84,993	87,777	3.3
AVE Y GUAJOLOTE EN PIE	3,357,857	3,397,695	1.2
AVE	3,329,594	3,369,915	1.2
GUAJOLOTE	28,263	27,780	-1.7
CARNE EN CANAL	5,621,725	5,720,120	1.8
BOVINO	1,704,985	1,744,737	2.3
PORCINO	1,162,398	1,174,581	1.0
OVINO	53,740	54,966	2.3
CAPRINO	43,242	43,867	1.4
AVE	2,636,485	2,681,117	1.7
GUAJOLOTE	20,875	20,852	-0.1
LECHE	10,713,794	10,838,487	1.2
BOVINO	10,549,038	10,676,691	1.2
CAPRINO	164,756	161,796	-1.8
OTROS PRODUCTOS			
HUEVO PARA PLATO	2,360,301	2,381,375	0.9
MIEL	56,071	55,684	-0.7
CERA EN GREÑA	2,218	2,016	-9.1
LANA SUCIA	4,754	4,683	-1.5

AVE: SE REFIERE A POLLO, GALLINA LIGERA Y PESADA QUE HA FINALIZADO SU CICLO PRODUCTIVO.
 LECHE: PRODUCCIÓN EN MILES DE LITROS.
 LOS SUBTOTALES Y EL TOTAL PODRÍAN NO COINCIDIR POR REDONDEO
 FUENTE: ELABORADO POR EL SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (S I A P), CON INFORMACIÓN DE LAS DELEGACIONES DE LA SAGARPA.

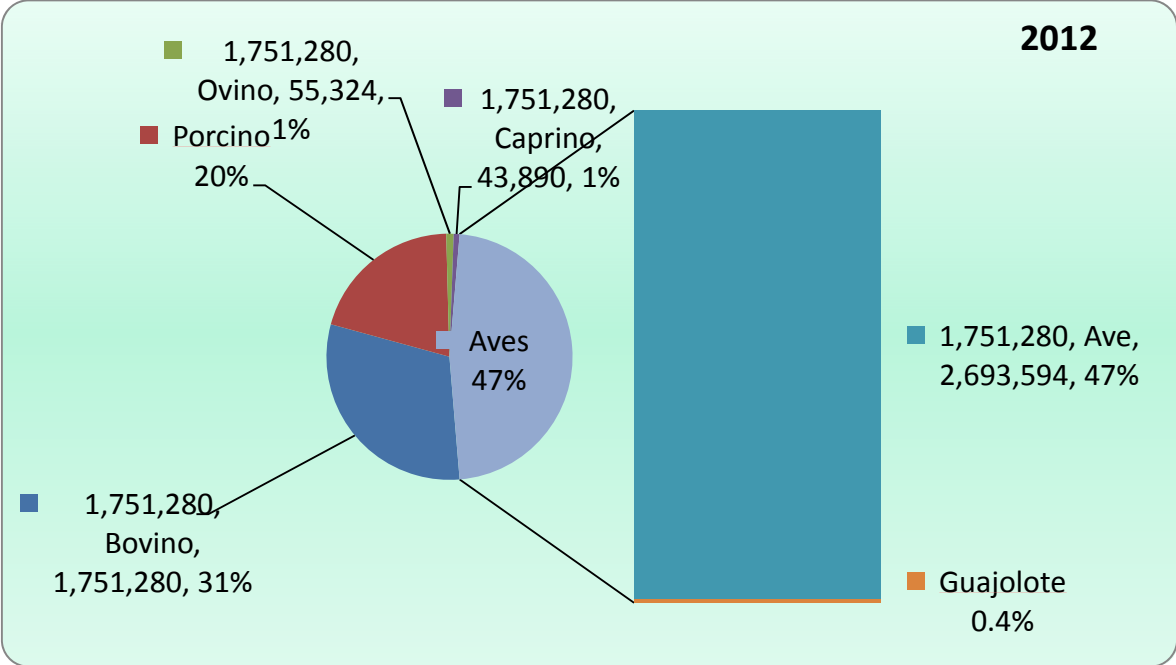
FUENTE: INEGI con datos SIAP

Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios

Bajo el entorno económico se puede mencionar, que la avicultura se encuentra en primer lugar en productos cárnicos y en segundo término el huevo de plato, se ha convertido en la proteína de origen animal más consumida de nuestro país y con tendencias bastante claras ya a nivel internacional. Para este 2012 el consumo de carne de pollo ofrece un 47% del total del consumo del país refrendando las tendencias ofrecidas después de 1990, datos mencionados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca (SAGARPA) de ese tiempo; aunque no todos los bloques cárnicos tienen ese mismo patrón, por mencionar la carne de bovino en 1990 obtenía el 41% del consumo total del país incluso ocupando el primer lugar, para 2012 se encuentra con un 31% siendo desplazado a un segundo término, la carne de cerdo que en

1990 se encontraba en proporción igual a la carne de pollo con un 28% hoy día solo ocupa un 21% del total de carnes consumidas (Cuadro 2), aunque el análisis de mercado lo comienzan a pronosticar como un mercado creciente. Hoy día, con estos análisis se ha pronosticado que la tendencia hacia el crecimiento de la producción avícola es evidentemente atractivo para varios sectores de nuestro país y dado esto se convierte en una industria próspera y consolidada.^{5,6}

Cuadro 2 - Producción cárnica del país en 2012



SAGARPA 2012^{5,6}

Al igual que en otras ramas de la producción ganadera, el aumento de los volúmenes de producción avícola lleva al crecimiento de consumo de alimentos balanceados y por tanto, de granos forrajeros, pastas y/o granos oleaginosas los que conforman parte fundamental de las dietas aplicadas para obtener los mayores niveles de productividad, aprovechando para ello el potencial productivo que la mejora genética confiere a las aves de engorda. La SAGARPA estimó para el censo de 2007 que la demanda de granos forrajeros por la industria de carne de ave (sin tomar en cuenta pavo)

fue de 4,994.1 millones de toneladas, dos mil toneladas por arriba de los consumidos por el sistema pecuario de bovinos, es importante resaltar que este consumo aparente refleja la necesidad de un mercado competitivo y con vías de expansión.¹²

Los granos en el alimento como se mencionó anteriormente son imprescindibles para la elaboración de concentrados proteicos balanceados^{7, 8} debido a que son productos perecederos es importante tener en cuenta las condiciones que mantienen estos granos durante su cosecha, transporte y almacenamiento ya que deben conservar características organolépticas y nutritivas para así tener un mejor rendimiento de los alimentos .¹²

1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES QUE DEBEN CONSERVAR LOS GRANOS

Bajo las mismas condiciones de almacenamiento, los granos pueden tener calidades diferentes dependiendo del tipo de grano que se coseche, la calidad inicial de los granos depende de los siguientes factores:¹⁰

- *Condiciones climáticas durante el período de maduración de la semilla*
- *Grado de maduración en el momento de la cosecha*
- *Daños mecánicos*
- *Impurezas*
- *Humedad*
- *Temperatura*
- *Insectos*
- *Roedores*
- *Microorganismos*

✓ *Condiciones climáticas durante el período de maduración de la semilla.*

Las condiciones del clima pueden ejercer influencia en dos etapas de la maduración de las semillas:

1era - La etapa en que la semilla está acumulando rápidamente materia seca en el campo, antes de ser cosechada; en esta etapa es indispensable el porcentaje de humedad en el suelo en cantidades adecuadas.¹⁰

2da- La etapa en que la semilla se muestra particularmente sensible, se presenta cuando alcanza su máximo contenido de materia seca; en este caso la semilla se deshidrata rápidamente para entrar en equilibrio con la humedad relativa del ambiente. Si durante esta etapa llueve mucho, la deshidratación será lenta y el contenido de humedad permanecerá elevado por un período mayor, lo que propicia que las semillas se deterioren con rapidez y se implanten a su vez microorganismos como son los hongos.¹⁰

✓ *Grado de maduración en el momento de la cosecha.*

Las semillas recolectadas antes o después del punto de madurez fisiológica son semillas con menor potencial de almacenamiento, ya sea porque no han alcanzado su máximo vigor o porque ya se inició el proceso de deterioración y por ende menor resistencia a los procesos biológicos.¹⁰

✓ *Daños mecánicos.*

Desde la cosecha hasta el momento del almacenamiento, los granos pueden sufrir impactos que les ocasionan grietas o fragmentaciones. Los granos quebrados se pueden eliminar durante el beneficio, pero no se eliminan los que presentan grietas y que permanecen con la masa de granos que va a ser almacenada. Estos granos se deterioran con gran facilidad y se convierten en focos reactivos que afectan a los granos sanos.¹⁰

Una semilla se puede dañar mecánicamente bajo las siguientes circunstancias: durante la cosecha, el almacenamiento y en la transportación.¹⁰

✓ *Impurezas.*

Los granos que contienen impurezas (fragmentos del mismo producto) y materias extrañas (residuos vegetales y cuerpos extraños, como tierra, etc.) son portadores de una mayor cantidad de microorganismos y presentan condiciones que facilitan su deterioro. El contenido de humedad es el principal factor que influye en la calidad del producto almacenado. Para obtener un almacenamiento eficiente, los granos deben tener un bajo contenido de humedad, ya que los granos húmedos constituyen un medio ideal para el desarrollo de microorganismos, insectos, ácaros y hongos.

✓ *Humedad y Temperatura*

Este es otro de los factores a considerar, los granos con alto contenido de humedad que son inadecuados para el almacenamiento, pueden conservarse en principalmente en refrigeración; los granos almacenados tienen menor posibilidad de deterioro cuando están fríos. Las bajas temperaturas pueden compensar los efectos de un alto contenido de humedad y evitar el desarrollo de microorganismos como los hongos, insectos y ácaros que atacan los granos almacenados.¹⁰

✓ *Insectos.*

Los insectos son importantes agentes parásitos que pueden causar daños a las semillas tanto en el campo como durante el almacenamiento, reduciendo drásticamente su calidad. Los insectos son portadores de hongos que pueden debilitar o consumir las semillas o atacar la planta que de ella se origina. Algunos insectos forman capullos y telas, que unen los granos formando conglomerados que hacen más difíciles las operaciones de aireación y control fitosanitario, además de favorecer crecimiento y proliferación de los hongos en el grano.¹⁰

Dentro de los invertebrados encontrados comúnmente en los granos de almacén se encuentran el *Sitophilus zeamays* (Gorgojo del maíz), *Prostephanus truncatu* (Barrenador grande de los granos), *Zabrotes subfasciatus* (Palomilla del maíz).¹⁰

✓ *Microorganismos.*

Los hongos son los principales microorganismos de la micro flora presentes en los granos almacenados y constituyen la más importante causa de pérdidas y deterioro durante el almacenamiento. Por lo general, los hongos que atacan los granos se dividen en dos grupos; hongos de campo y hongos del almacenamiento, (Cuadro 4).¹⁰

Cuadro 4 - Hongos de campo y almacén (generalidades)

TIPO DE HONGOS	HUMEDAD RELATIVA (HR)	TEMPERATURA DE PROLIFERACIÓN	O ₂ / CO ₂	SUSTRATO	HONGO
Flora de Campo	> 95%	Baja	Aerobia	Fitopatógeno plantas vivas	<i>Fusarium, Alternaria, Cephalosporium, Cladosporium, Helminthosporium</i>
Flora Intermedia	> 95 %	Relativamente Baja	Aerobia	Cereales recién cosechados y aún húmedos	Algunos <i>Fusarium</i>
Flora de Almacén	< 95 %	20 – 25 °C	Anaerobia facultativa	Material fisiológicamente inactivo	<i>Aspergillus, Penicillium</i>

Moreno 1996 ¹⁰

Hay varios tipos de flora fúngica contaminante de alimentos para piensos:¹⁰

- *Hongos de campo.*

Así son llamadas las especies que contaminan los granos antes de la cosecha, durante su desarrollo en la planta. Estos hongos necesitan para su desarrollo un alto contenido de humedad; las esporas de estos hongos pueden sobrevivir durante mucho tiempo en los granos húmedos; sin embargo, no germinan cuando el contenido de humedad está en equilibrio con humedades relativas inferiores al 75%.¹⁰

- *Hongos del almacenamiento.*

Estos hongos se desarrollan después de la cosecha, los hongos que proliferan con mayor frecuencia en los granos almacenados son algunas especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*. Las principales pérdidas ocasionadas por hongos en granos y cereales se deben a: la disminución del poder germinativo, a los cambios bioquímicos, a la pérdida de materia seca, en los silos y bodegas, los daños causados por los hongos del almacenamiento son mayores que los producidos por los hongos de campo, además que pueden contaminar con metabolitos secundarios. Es importante resaltar que en la mayoría de los ataques masivos hacia los granos prevalecen en gran porcentaje los hongos es por ello que se tratara de abarcar más acerca de los mismos además que son de los microorganismos que son de mayor distribución mundialmente.^{9,10}

- *Hongos de instancia intermedia.*

Los hongos que se encuentran en esta importante fase son aquellos que se implantan momentos después del corte y manipulación de los granos hasta su llegada a los centros de almacenamiento, se destaca su importancia ya que sirven como mecanismos intermediarios para la implantación de otros hongos

que serán importantes en almacén. Los más representativos de esta etapa son los hongos del género *Fusarium*.^{9,10}

1.3 CARACTERÍSTICAS PARA QUE LOS HONGOS CON CAPACIDAD TOXIGENA SE DESARROLLEN Y PRODUZCAN MICOTOXINAS

1.3.1 FACTORES FÍSICOS

a) Humedad y Agua disponible (aw).

La cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos es uno de los factores importantes para el desarrollo de los hongos y para la producción de micotoxinas; sin embargo no sólo influye la cantidad de agua sino también la forma de presentación de la misma, así pues, el agua se encuentra en forma libre o ligada.

El agua libre existe dentro y alrededor de los tejidos vegetales o de las células y puede ser eliminada sin interferir seriamente con los procesos vitales.

La forma combinada está presente en los tejidos vegetales y animales, formando parte integrante de las células que los componen y en unión con las proteínas y glúcidos. Para la germinación de las esporas de hongos, es necesario que el agua se encuentre en forma libre.¹¹

Existen dos grandes unidades relacionadas con la cantidad de agua, a saber:

- *Humedad relativa de equilibrio (HRE):* es la cantidad de humedad de la que disponen los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio entre la humedad libre del producto y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La HRE se expresa en porcentaje y varía de unos alimentos a otros conformes su riqueza en glúcidos o en materia grasa.^{11,9}
- *Agua disponible (aw):* Es el grado de interacción del agua con los demás constituyentes.¹² La aw nos indica cual es la cantidad de agua disponible para el

desarrollo de los microorganismos una vez se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema alimento/medio ambiente.^{11,9}

La a_w se expresa como la relación existente entre la tensión del vapor de agua en el sustrato (P) y la del agua pura (P0), a la misma temperatura, ($a_w = P/P0$). Si la humedad del alimento está en equilibrio con la humedad relativa de equilibrio (HRE) de la atmósfera que lo rodea, la a_w en el alimento es numéricamente equivalente a ésta, ($a_w = HRE/100$).⁹

Hay que tener en cuenta que la HRE se refiere a la atmósfera en equilibrio con el producto y la a_w se refiere al propio producto. El agua pura tiene una a_w de 1 y está en equilibrio con una atmósfera de 100% de HRE. La a_w de un alimento es siempre menor que 1.⁹

Los valores de a_w que los diversos grupos de hongos necesitan varían de acuerdo con el sustrato y la temperatura, ahora bien, algunos valores de a_w necesarios para el desarrollo de algunos hongos y para la producción de micotoxinas, la mayoría de los hongos que contaminan los cereales se necesita valores por encima de los 0.7 a_w .⁹

La influencia del factor a_w en el metabolismo de las micotoxinas solo está suficientemente estudiado para las aflatoxinas, ocratoxinas, ácido penicílico y patulina. Sin embargo la producción de micotoxinas es nula o muy baja con a_w inferior a 0,85 y no obstante el crecimiento de hongos toxigenos ya se puede producir en un intervalo de a_w de 0,70-0,85.⁹

Aunque el valor porcentual de humedad libre de un alimento solo nos da una orientación para juzgar las posibilidades de crecimiento y multiplicación de los hongos, se puede considerar que valores de humedad inferiores al 13% suelen presentar un crecimiento y proliferación fúngica bajos y a medida que la humedad aumenta, el crecimiento y proliferación fúngicas se aceleran, pudiendo ser de forma importante para valores de humedad del 16%.⁹

b) Temperatura

La temperatura óptima para el desarrollo de los hongos se encuentra entre 25 y 30 °C y el límite máximo entre 40 y 45 °C. La mayor parte de los hongos no crecen por debajo de 5 °C y que sin embargo hay hongos como el *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus* y *Aspergillus fumigatus* que pueden crecer sin problemas hasta los 55 °C y otros como el *Penicillium expansum* y el *Penicillium cyclopium* que son capaces de crecer a 0 °C.⁹

Existen en algunos casos, una proximidad entre la temperatura mínima necesaria para el crecimiento del hongo y la que se precisa para la producción de la micotoxina y en general también sucede con la temperatura óptima. Sin embargo hay algunas excepciones, *Aspergillus flavus* crece en el arroz entre 6-45 °C con un óptimo a 37 °C y la producción de aflatoxina se efectúa entre 11 y 36 °C con un máximo de producción de 30 °C.⁹

La HRE varía de semilla a semilla, conforme ésta sea amilácea o bien oleaginosa por ello es la relación entre la humedad de varios cereales, semillas y las diferentes humedad relativa (HR) dentro de un mismo intervalo de temperatura.⁹

Dentro de este intervalo de temperatura, los granos de cereales (maíz, trigo y sorgo) mantenidos en estado de equilibrio a un nivel de humedad de 13% o menos (lo que correspondería a una humedad relativa de equilibrio del 65%), se pueden almacenar con seguridad durante un tiempo indefinido. No se puede decir para la soya integral y mucho menos para el girasol integral (semilla de girasol), donde un 13% de humedad en estado de equilibrio correspondería a una HRE de casi 85%.⁹

Cualquier semilla almacenada en estado de equilibrio con una HR por debajo de 65%, es poco probable de no ser invadida por hongos propios.⁹

Cereales como el trigo, maíz y sorgo con niveles de humedad de 13,5-14% serán invadidos por hongos tales como *Aspergillus restrictus* y *Aspergillus halophilicus*. Si la humedad fuera de 15% o más, la invasión fúngica más común sería por *Aspergillus glaucus*.⁹

El trigo el maíz y el sorgo necesitan un 18% de humedad. La soya necesita un 17-18% y el cacahuate necesita solo un 9-10% de humedad.⁹

En base a lo anterior se tendrá que tomar en cuenta que el almacenamiento de un cereal o de una semilla oleaginosa no puede ser efectuado con el mismo valor de humedad, para preservar el desarrollo fúngico y una posible producción de micotoxinas.⁹

c) Zonas de micro flora

En un silo pueden existir pequeñas zonas con alto contenido de humedad, susceptibles de desencadenar un desarrollo fúngico, lo cual puede después provocar un aumento general de humedad en el sustrato y consecuentemente una mayor contaminación fúngica y predisposición para la producción de micotoxinas.⁹

d) Integridad física de los granos

Los tegumentos intactos del grano dificultan el acceso del hongo al almidón endospermico. Los granos partidos son más susceptibles de invasión y desarrollo fúngico, que los granos enteros. Esencialmente esto es debido a un aumento de la superficie de cultivo y una mayor predisposición para que el hongo contacte con la parte interna del grano, la cual es más vulnerable que la pericarpa o parte externa.⁹

1.3.2 FACTORES QUÍMICOS

a) pH.

Los hongos toleran un gran intervalo de pH (2.5-7.5), de un modo general soportan mejor el medio ácido que el alcalino. Es de destacar que ellos mismos son capaces de alterar el pH, utilizando como fuente de energía los ácidos orgánicos del alimento o los

excretados por bacterias acidificantes que pueden aparecer durante el periodo de deterioro del alimento.⁹

b) Composición del sustrato.

Los hongos no son exigentes desde el punto de vista nutricional y ellos se nutren de los macro y micro elementos existentes en el sustrato donde se desarrollan. Sin embargo la composición del sustrato está muy ligada a la producción de la micotoxina.⁹

Están descritos estudios en cereales y semillas de oleaginosas previamente esterilizadas en autoclave e inoculadas con estirpes de *Aspergillus parasiticus*, el crecimiento de éste en la soya fue excelente y la baja producción de aflatoxina fue solo debida a la composición del sustrato.⁹

c) Nutrientes minerales

Están relacionados con la composición del sustrato y a pesar de que el hierro y el zinc son los elementos más importantes para un desarrollo fúngico, tanto estos como otros pueden ser necesarios para la producción de micotoxinas.⁹

En un estudio se encontró que las concentraciones óptimas de ciertos minerales para la producción de ocratoxina A por el *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 fueron de: 0,055-2,2 mg/l de zinc., 0,004-0,04 mg/l de cobre., 1,2-2,4 mg/l.⁹

Cuando disminuyeron las concentraciones de zinc y cobre la producción de ocratoxina A fue casi nula. La falta de algunos de esos elementos da como resultado un pobre crecimiento fúngico y una no producción de ocratoxina A.⁹

En el caso de aflatoxina, son necesarios sustratos ricos en zinc y ciertos aminoácidos para que el *Aspergillus flavus* metabolice la aflatoxina.⁹

d) Potencial de óxido-reducción (O₂/CO₂).

La mayor parte de los hongos son aerobios y por lo tanto necesitan oxígeno para el desarrollo de sus reacciones metabólicas. Una carencia de oxígeno condiciona el crecimiento de los hongos y la ausencia total puede llegar a producir la muerte de éstos.⁹

El anhídrido carbónico puede inhibir la formación de algunas micotoxinas, como las aflatoxinas. Una atmósfera con 20 a 40% de CO₂ en combinación con una temperatura reducida (17°C) o bien una humedad relativa reducida o ambos factores, previenen la producción de aflatoxina en cacahuates.⁹

1.3.3 FACTORES BIOLÓGICOS

a) Presencia de invertebrados

La presencia de insectos actúa como agente de diseminación de la micro flora y por lo tanto contribuye al crecimiento y multiplicación de los hongos. El propio metabolismo del insecto eleva el contenido de humedad del sustrato y además la rotura del pericarpio permite la infección del interior del grano.⁹

b) Cepas específicas

En una misma especie fúngica, no todas las cepas se comportan de la misma forma. En un estudio se encontró que la cepas NRRL 1957 de *Aspergillus flavus* no produce aflatoxina, sin embargo ella es producida por cepas como: NRRL 3251, NRRL 3357, NRRL 3517 y NRRL 3353.^{13,14,15,16,}

Dentro del principal contaminante fungico para los cereales se encuentra en un alto porcentaje el género *Aspergillus*.⁹⁻¹⁶

1.4 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Aspergillus*.

REINO	<i>Fungi</i>
FILO	<i>Ascomicita</i>
ORDEN	<i>Eutoriales</i>
FAMILIA	<i>Trichocomaceae</i>
GENERO	<i>Aspergillus</i>
ESPECIE	<i>flavus</i>

Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos dentro de estos las más comunes son:

- *A. fumigatus* (85%)
- *A. flavus* (5-10%)
- *A. niger* (2-3%)
- *A. terreus* (2-3%)
- *A. versicolor,*
- *A. nidulans,*
- *A. glaucus,*
- *A. clavatus,* (4-6%)
- *A. cervinus,*
- *A. candidus,*
- *A. flavipes,*
- *A. ustus.*

Los hongos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones.^{15, 16, 17, 18}

1.4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS GENERALES DEL GENERO *Aspergillus*.

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el substrato. En los *Aspergillus*, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula llamada fiálide. En algunos *Aspergillus* hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos.¹⁵

Las características macroscópicas y microscópicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar los *Aspergillus* en secciones o grupos.¹⁵

1.4.2 CRECIMIENTO DE *Aspergillus*.

La mayoría de las especies crecen sobre Czapek-Levadura salvo algunos además se adiciona 20% de Sacarosa La temperatura de incubación es de 25° y 37 C °, aunque la

mayoría de los *Aspergillus* se equilibra en 27° C. La ornamentación de los conidios cambia con la edad y en unas dos semanas las esporas están totalmente maduras.¹⁶

Para el aislamiento se usan medios selectivos con inhibidores de la proliferación bacteriana y del desarrollo exuberante de algunos hongos dando oportunidad a todas las esporas de originar una colonia aunque restringida, si solamente interesa determinar la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* suele sembrar sobre el medio *Aspergillus flavus and parasiticus* (AFAP) que es selectivo para dichas especies.¹⁶

Con el fin de comprobar que los medios utilizados son adecuados para observar la velocidad de crecimiento y las características macro y microscópicas, es conveniente sembrar cepas obtenidas de una colección de referencia. La degeneración de las cepas (pleomorfismo) es un problema de muchos hongos, los cuales sufren cambios morfológicos como colonias algodonosas, reducción de la esporulación y modificaciones de los conidióforos, asociado a la pérdida de la capacidad de producir toxinas.¹⁶

1.5 MICOTOXINAS

1.5.1 HISTORIA DE LAS MICOTOXINAS

El conocimiento de la existencia de las enfermedades en el hombre y en los animales, asociadas al crecimiento de hongos en los alimentos, data de siglos atrás. Tal es el caso del ergotismo enfermedad asociada al consumo de alimentos contaminados con el cornezuelo del centeno, llamado por los Asirios “pústula nociva en la espiga del centeno” provocaba que la embarazada abortara y muriera en el lecho del parto.^{6, 17, 22, 19, 20, 21, 22, 23,}

En la Edad Media aparecieron por primera vez descripciones de envenenamiento por el cornezuelo; se registraron epidemias cuyo síntoma característico era gangrena de pies, piernas, manos y brazos, se decía que las personas eran consumidos por el fuego sagrado y se ennegrecían como el carbón, por lo que la enfermedad se denominó Fuego Sagrado o Fuego de San Antonio, en honor al beato en cuyo santuario se buscaba la curación. Es probable que el alivio encontrado al viajar al santuario fuera real, pues los peregrinos no consumían centeno contaminado durante el viaje. En 1815 fue posible determinar la naturaleza fúngica del parásito del Cornezuelo del Centeno y en 1875 se identificaron los componentes tóxicos del hongo *Claviceps purpurea*, como responsables del ergotismo.^{6, 17, 22, 24, 25, 26, 27, 28,}

En 1934 en Illinois, Estados Unidos, murieron 5 mil caballos al consumir maíz contaminado con hongos. Para 1939 se aislaron dos toxinas del *Aspergillus fumigatus* una hemolítica y otra pirógena.^{6, 17, 22, 29, 30, 31, 32, 33,}

En 1940 el distrito de Orenburg (URSS) se vio afectado por una epidemia de aleukia (leucopenia) tóxica alimentaria (ATA), enfermedad que disminuye los glóbulos blancos y disminuye la resistencia a las enfermedades, debido al consumo de mijo contaminado con tricotecenos, produjo numerosas muertes, llegando hasta el 10% de la población en algunas comarcas. Se identificó como responsable la toxina. Fue hasta 1962 cuando una

serie de circunstancias hizo cambiar la actitud adoptada frente a los hongos en los alimentos humanos y animales: la aparición de una enfermedad en los pavos en Inglaterra, que llevó a la muerte a 10 mil pavitos denominada la enfermedad X (Turkey X disease). La investigación permitió concluir que la causa de la muerte de las aves era una sustancia producida por el hongo *Aspergillus flavus*. Al poco tiempo hubo brotes similares que afectaron a otras aves de corral. El origen de la enfermedad se encontró en apelmazados de prensado de cacahuates mezclado en el alimento, con rapidez sorprendente se detectó el hongo responsable, el *Aspergillus flavus* y también fueron aislados sus metabolitos tóxicos, las aflatoxinas (acrónimo de *Aspergillus flavus toxin*).

A partir de 1961, con el aislamiento de las aflatoxinas producidas por el *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, se evidenció la importancia de los hongos saprofitos en el desarrollo de procesos patológicos en animales y la posible conexión con la patología humana.^{6, 17, 22, 34,32, 35, 36, 37, 38,}

A raíz de las observaciones anteriores, tanto la medicina humana como la medicina veterinaria han dado cada vez más importancia a las micotoxinas, sobre todo después de saber que incluso contenidos muy pequeñas de estas pueden comprometer no sólo la salud humana, sino también la salud de los animales, causando grandes pérdidas económicas. Por lo anterior se ha fomentado la búsqueda sistemática de las micotoxinas; como resultado de estos estudios llevados a cabo durante 50 años, hoy se conocen más de 500, sus preferencias por los diversos sustratos, su composición, su estructura química y las diferentes especies de hongos que las producen.⁶⁹

1.5.2 GENERALIDADES DE LAS MICOTOXINAS

Micotoxina proviene de los raíz griega *Mico*=Hongo y *Toxina* = Veneno, siendo considerado como tal y tan conocido veneno de hongo, las micotoxinas son metabolitos

secundarios producidos por ciertos hongos y en pequeñísimas contenidos pueden ser tóxicos a los animales que las ingieren.³⁹

Evidencias actuales que se tienen sobre la importancia de los diferentes hongos toxígenos que invaden a granos indican que los géneros más importantes son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* se ha encontrado que estos tres géneros comprendían el 58% de 943 cepas de hongos, a los que les probaron su toxicidad.²¹

La presencia de micotoxinas en los productos alimenticios, depende de cepas específicas de hongos y estas cepas están sujetas a la influencia de factores ambientales como la humedad y la temperatura. Por lo tanto, la contaminación micotóxica de los productos alimenticios puede variar según las condiciones geográficas, climáticas, métodos de producción, tipos de almacenamiento y también según el tipo de alimento. Algunos productos alimenticios son sustratos más aptos que otros para el crecimiento de los hongos y producción de toxinas. Dentro de las micotoxinas más importantes esta la aflatoxina, ocratoxina, desoxinivalenol, fumonisinas, patulina y zeralenona por mencionar algunas.⁴⁰

1.5.3 INTERACCIONES MICOTOXINAS-NUTRIENTES EN LA DIGESTIÓN

En primer término, los efectos de las interacciones aflatoxinas-nutrientes han mostrado un deterioro de la digestión, acompañado de la disminución de la actividad de las enzimas digestivas, lo cual ha constituido el eje de convergencia para tratar de explicar las interacciones micotoxinas-nutrientes que se producen en el proceso de digestión de los alimentos. En este sentido, las interacciones micotoxinas-lípidos de la dieta son las responsables de ocasionar las principales manifestaciones de desorden digestivo que resultan como una consecuencia del efecto inhibitorio que tienen muchas micotoxinas sobre las enzimas digestivas a consecuencia de sus efectos adversos sobre la síntesis de proteína. Estas manifestaciones son producto de la alteración del proceso de digestión de

las grasas, lo cual se expresa en un síndrome de mala absorción, donde la presencia de lípidos en heces es la principal evidencia del mismo.^{41,70}

✓ Interacciones con los lípidos

Interacciones aflatoxina-lípidos, se corresponde con la instauración de un proceso de degeneración grasa a nivel hepático. En aves, se sabe que la aflatoxina produce una reducción significativa de los lípidos en sangre, lo que aunado a la condición de acumulación de lípidos en el hígado, permiten inferir un efecto de inhibición general del transporte de lípidos a consecuencia de esta toxina. A esta condición se le suma una reducción marcada de la actividad de los sistemas microsomal y citosol en el hígado viéndose comprometida la síntesis de ácidos grasos. Esta evidencia sugiere que la aflatoxina afecta la síntesis de lípidos interfiriendo la síntesis de enzimas involucradas en el metabolismo lípidico.⁷⁰

✓ Interacciones con proteínas

Los resultados sobre este aspecto muestran que la acción adversa de las aflatoxinas sobre el crecimiento de las aves y letalidad en otras especies puede ser minimizada por un incremento en el contenido de proteína de la dieta lo que hace pensar que algún tipo de Interacción entre la micotoxina y la proteína reduce la disponibilidad de las mismas. Muy poco se conoce de las posibles interacciones micotoxinas-aminoácidos, no obstante se sabe que el efecto adverso se produce sobre la digestión de las proteínas y no así sobre la absorción de los aminoácidos; destacándose un aumento significativo en la velocidad de absorción de metionina en aves afectadas por aflatoxina. Se conoce que la aflatoxina incrementa los requerimientos de metionina y siendo este el principal aminoácido limitante en las aves, es posible que al verse comprometida la digestión de proteínas se produzca un efecto aditivo con la aflatoxina deprimiéndose significativamente la tasa de crecimiento.⁷⁰

✓ Interacciones con carbohidratos

Este tipo de interacción ha sido muy poco estudiada. En pollos, las evidencias que se tienen hasta el presente, de alteración de las enzimas que regulan el catabolismo del glicógeno y el proceso de neogénesis interfiriéndose la utilización del almidón.⁷⁰

✓ Interacciones con minerales

Sobre este particular los estudios de que puede causar anemia; no habiéndose establecido claramente los procesos metabólicos que conllevan a la misma. Se sabe que la anemia por aflatoxicosis es de tipo hemolítica; siendo los pollos jóvenes los más afectados ya que el metabolismo del hierro se afecta significativamente sin poder responder a las altas demandas del ave producto de su rápido crecimiento.

Existen evidencias que indican que la aflatoxina ocasiona interacción aflatoxina-zinc y aflatoxina-cobre cuyos efectos se manifiestan en una disminución del Zinc a nivel hepático y en un incremento del cobre en plasma, requiriéndose estudios profundos sobre la significancia clínica de estas interacciones.⁷²

1.6 AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son las toxinas más estudiadas y son producidas por algunas cepas de *Aspergillus flavus* (*A. Flavus*) y *A. parasiticus*. Se han descrito hasta hoy 18 tipos distintos de aflatoxinas, las más comunes son las aflatoxinas (B1, B2, G1, G2, y M1, M2), se pueden encontrar en productos tales como la soya, el maíz, los cacahuates y otros granos, frutos secos y semillas oleaginosas.⁴¹

Pero las aflatoxinas también pueden llegar al consumo humano a través de productos animales; las vacas, al ingerir productos contaminados con aflatoxinas, metabolizan las aflatoxinas B1 y B2 a aflatoxinas M1 y M2, que se excretan en la leche.⁴¹

En animales de granja, las aflatoxinas producen una afección del crecimiento, disminuyen la eficiencia alimentaria, deprimen la respuesta inmunológica y eventualmente pueden llegar a causar la muerte. En definitiva, un descenso en la productividad.⁴²

1.6.1 BIOSINTESIS DE AFLATOXINA

Existen 2 series o tipos de aflatoxina la B y la G, las cuales difieren químicamente ya que esta última presenta un anillo 3-lactona, en cambio la serie B presenta un anillo ciclo-pentano, además las series AFG1 y AFB1 presentan una doble ligadura en el carbono 8-9 en lugar de una unión vinil éter, esta es importante ya que es el que bajo un espectro de luz fluoresce, dado este efecto se hace factible su diagnóstico.⁴³

En el caso específico de *Aspergillus flavus* muy rara vez sintetiza G1, G2 (el mecanismo por el cual no lo hace todavía, se encuentra bajo estudio).⁴³ También existen sub metabolitos como el Q1, P1 y Aflatoxicol estos pueden estar presentes en la forma mencionada, ya sea en hígado y orina de muchos mamíferos incluyendo al hombre.⁴⁴

No se conoce el papel fisiológico del metabolito en el desarrollo del hongo; pero se existe una estrecha asociación entre la biosíntesis de aflatoxinas, lípidos y síntesis de proteínas, las cuales disminuyen durante la fase de producción de aflatoxinas. Al crecer inicialmente el hongo existe muy poca o ninguna producción de aflatoxinas, pero al reducirse los niveles de fosfatos y nitrógeno en el medio, el metabolismo primario se desorganiza, se acumulan varios metabolitos primarios y se empiezan a producir las aflatoxinas, además de que existen cepas en las que no existe la producción de estas toxinas, por lo que se asume que estos metabolitos no son esenciales para su desarrollo.⁴³

Para que las aflatoxinas puedan causar daño es necesario que se dé el encuentro entre hospedero y huésped además de que se den los factores medio ambientales para que así quede interrumpida la triada de la salud y el fenómeno enfermedad se presente; es necesario que el hospedero (ave) este en contacto con alimento contaminado con aflatoxinas las cuales tendrán que tener cierto contenido y el factor tiempo de presentación del agente es de suma importancia; posteriormente se tiene que llevar a cabo dos puntos importantes para el organismo una vez que algún fármaco o toxina se encuentra dentro de mismo:

1.- Farmacocinética; la cual abarca desde la absorción, distribución, y eliminación de un agente y que este a su vez tendrá que bio transformarse y excretarse.

2.- Farmacodinamia; el agente en su paso por el organismo genera mecanismos de acción de un fármaco o toxina, incluyendo la acción y cambios bioquímicos a nivel celular, así como el efecto y sus consecuencias marcados en los órganos blancos.⁴⁵

Existen tres vías de entrada al organismo, dado que *Aspergillus* es uno de los principales hongos contaminantes de los granos estos, son el principal sustento del sector pecuario es un hecho que la vía de entrada primaria al organismo es por vía digestiva, la absorción que sufre la aflatoxina en el lumen, puede ser total o parcial y esto depende de la especie animal que se esté involucrada aunque se sabe que a nivel intestinal la absorción es por difusión pasiva y dependiente de la composición lipídica del epitelio intestinal, posteriormente llega al torrente sanguíneo y de ahí parte hacia los diferentes órganos blanco y depósitos de grasa, pero el mayor acumulo ocurre en los órganos involucrados con la bio transformación y eliminación de los desechos alimenticios como son por el hígado y el riñón.⁵⁷ En segundo lugar de importancia se encuentra el pulmón, seguido por la piel dado que las aflatoxinas son compuestos liposolubles y por esta característica es más fácil su absorción.

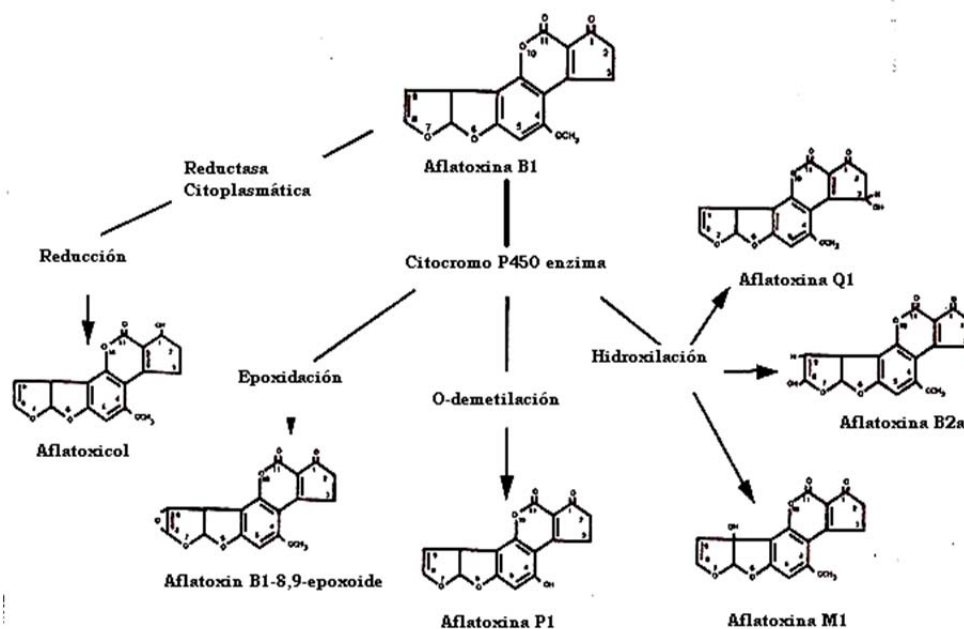
Una vez que la aflatoxina se encuentra en torrente circulatorio se aloja principalmente en hígado y por medio de complejo enzimático citocromo P450 así como la citocromo 488 la bio transforman en compuestos de índole hidrosoluble, por medio de una hidroxilación en M1, Q1, aflatoxicol RO, y por medio de una O-dimetilación en P1 todos estos submetabolitos con la característica de ser de menor toxicidad que AFB1.⁵⁷

Otro de las vías de transformación de la aflatoxina es por medio de una epoxidación de la toxina, el submetabolito resultante es un epóxido conocido como aflatoxina 8,9 epóxido el cual tiene una alta afinidad al DNA celular y como ya es conocido da la formación de un compuesto denominado aducto (complejo entre la molécula de ADN y un compuesto químico ajeno a la estructura polinucleotídica de la doble hélice, a través de un enlace covalente, causando distorsiones genéticas), que en aflatoxinas será

8-9 dihidro-8-(N⁷-guanina)-9 hidroxi-AFB (AFB₁-N⁷-Gua) el cual va a modificar la secuencia del ADN celular y dando origen a mutaciones y problemas de cáncer.^{46, 57}

Un submetabolito más es el aflatoxicol (R0) (I-6) este compuesto es 18 veces menos inofensivo que AFB₁, no se origina a partir de enzimas microsomales ya que depende de enzimas del citoplasma celular, si este compuesto sufre una oxidación por medio de deshidrogenasas revirtiendo su estructura a AFB₁, dado este proceso se considera como un reservorio de AFB₁ (Cuadro 4).⁴⁷

Cuadro 4 - Síntesis de AFB



Gimeno 1999⁴⁷

La presencia de aductos AFB₁-albúmina en sangre, es indicativo que la toxina fue metabolizada hasta epóxido ya sea en el lumen del intestino, en la pared de este o en sangre, y su presencia es usada como biomarcador de exposición a AFB₁.⁴⁸

Desde el punto de vista bioquímico, las aflatoxinas son consideradas como inhibidores bio-sintéticos y en el caso de la AFB1, se ha encontrado que su actividad biológica tiene varias fases:⁴⁹

- 1) Interacción con el ADN e inhibición de las polimerasas responsables de la síntesis tanto de ADN como ARN.
- 2) Supresión de la síntesis del ADN.
- 3) Reducción de la síntesis del ARN e inhibición del ARN mensajero.
- 4) Alteraciones en la morfología del nucléolo.
- 5) Reducción de la síntesis de proteínas.

Bioquímicamente, las aflatoxinas pueden alterar el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, así como el metabolismo energético. Las aflatoxinas pueden ser consideradas como inhibidores biosintéticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Altas dosis pueden provocar una inhibición total de los sistemas bioquímicos, y dosis bajas pueden afectar diferentes sistemas metabólicos⁵⁰. El metabolismo de los carbohidratos también se ve afectado, inhibe la síntesis de glicógeno a través de la acción sobre las enzimas glicógeno sintetasa y transglicosilasa. Otro de los problemas que ocasionan las aflatoxinas es el de incrementar el nivel citosólico del NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos, por lo que se produce una acumulación de lípidos en el hígado.⁵¹

1.6.2 UNIÓN DE LA AFLATOXINA AL ADN DANDO ORIGEN A LA FORMACIÓN DE ADUCTOS.

La aflatoxina B1 (AFB1) está entre los más potentes carcinógenos conocidos para algunas especies animales y el hombre. La capacidad de la AFB1 para producir mutaciones

se conoce por la habilidad de un metabolito activado para unirse covalentemente a la guanina del ADN en la posición N-7 (aducto) y esta reacción podría ser importante en el inicio del cáncer.

Estudios epidemiológicos realizados en Asia y África han asociado la incidencia de cáncer primario del hígado con el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas.

Los mecanismos para la unión con el ADN son:

- Intercalamiento de la toxina en la estructura helicoidal del ADN.⁵²
- Oxidación de los carbonos no saturados (C₈ y C₉) de la parte terminal furano de la molécula de AFB₁ por el sistema microsomal de oxidasas de función mixta (organización compleja de enzimas de las células hepáticas NADPH dependientes, unidas al citocromo P-450) para formar un intermediario.²⁷
- El ataque del C₈ de AFB₁ sobre el N₇ de la guanina y la formación de una ligadura covalente en la interacción AFB₁- N₇- Guanina. El daño en la molécula de ADN por esta interacción se manifiesta de varias maneras; el aducto es cortado de la molécula de ADN y se inducen errores en el mensaje o bien, el aducto no es cortado pero es convertido en AFB₁-formamidopirimidina que también es causante de errores en la transcripción. Como consecuencia en el daño del ADN se origina la mutagénesis y carcinogénesis y si se trata de un feto se presenta la teratogénesis⁵³.

Para eliminar las aflatoxinas de manera general una vez que se hidroxilan, epoxidan, o se O-dimetilan se conjugan con ácido glutatión para posteriormente ser eliminados por bilis y desecharse por el vía digestiva o poder llegar a sangre posterior a riñón y excretarse en orina. Respecto al efecto residual, se tienen evidencias de que la AFM 1 se elimine a través del huevo o leche.²⁷

1.7 AFLATOXICOSIS AVIAR

Desde los acontecimientos en Inglaterra en 1960, se han desarrollado numerosas investigaciones acerca del efecto de las aflatoxinas tanto en el hombre como en los animales y en este último es muy importante debido a que se ha detectado baja ganancia de peso y de conversión alimenticia por lo tanto desarrollo lento, problemas en la producción en general, desordenes respiratorios, intestinales, inmunológicos, sanguíneos, y tisulares así mismo como infección por agentes oportunistas secundarios incluso muchos de estos pudiendo causar muerte en el individuo o los individuos que tengan contacto con estas toxinas.⁷²

Las aflatoxinas se consideran los contaminantes biológicos de los alimentos más extendidos a nivel mundial y está clasificada como uno de los más importantes tóxicos (DL₅₀ 1-50 mg/kg) para muchas especies animales. Dentro de las especies más susceptibles por dicho tóxico se encuentran los patos, los leporinos, los felinos, mientras que los ratones, hamsters, ratas y pollos de engorda y gallinas de postura son los más resistentes.

La toxicidad de dicho agente, depende en un porcentaje alto del tipo de toxina involucrado así como la dosis y el tiempo de exposición de la misma. Además de ser peligrosas, ya que se conoce que poseen propiedades cancerígenas, mutágenas y teratógenas.⁵⁴

1.7.1 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS AFLATOXINAS

Uno de sus principales efectos de las aflatoxinas es la toxicidad hacia diferentes órganos uno de los principalmente involucrados es el hígado, dependiendo de la duración de la exposición y de la contenido, puede presentarse una toxicidad aguda o crónica.

La exposición crónica a niveles bajos de aflatoxinas es muy probable que ocurra con mayor facilidad que una exposición aguda. En la literatura, existen evidencias de que una exposición crónica a AFB₁ en animales de experimentación, produce cáncer e hipertrofia del hígado.^{55, 56, 57}

Un efecto importante es la citotoxicidad, *in vitro* se ha probado la citotoxicidad causada por las aflatoxinas. En general, los efectos se han estudiado en líneas celulares como células embrionarias de pato, células hepáticas de mono, de riñón, células hepáticas de embrión humano, células epiteliales de mono, etc. También está demostrado que la AFB₁ puede afectar el ciclo celular y la mitosis de algunas células, especialmente hepatocitos.⁵⁸

Existen diversos efectos ya conocidos por las aflatoxinas siendo uno de los más importantes la inmunosupresión, estas pueden debilitar la respuesta del sistema inmune celular y humoral, provocando un aumento en la susceptibilidad de los animales hacia enfermedades causadas por bacterias, hongos y parásitos. Además, pueden existir efectos inmunotóxicos sin observarse patologías clínicas aparentes.⁵⁹

Existe un efecto mutageno, dentro de los bioensayos empleados para medir mutagenicidad de las aflatoxinas se pueden citar: detección de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, cultivos pulmonares embrionarios humanos, células de riñón de rata, hámster y células HeLa; mutaciones en microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Neurospora crassa*, *Salmonella typhimurium*, *Drosophyla*

melanogaster, células T de riñón humano, cultivo de leucocitos humanos e inducción de fagos en bacterias lisógenas.⁶⁰

La carcinogenicidad es otro efecto de las aflatoxinas, en el desarrollo de un tumor canceroso se puede dividir en las siguientes etapas; iniciación, promoción y progresión. Además, las lesiones pre neoplásicas y malignas en humanos están caracterizadas por la expresión de cambios enzimáticos, análogos a los observados en modelos animales con tumores en el colon, estómago, intestino delgado, esófago, cavidad oral, hígado, tejidos pulmonares y mamas.^{22,61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70,}

La capacidad de las distintas aflatoxinas para inducir tumores en especies animales difiere considerablemente, siendo uno de los principales motivos la variabilidad en cuanto a su metabolismo, distribución y excreción, por lo que las cantidades mínimas necesarias para la inducción de cáncer son también dependientes de estas propiedades, sin perder de vista, además, la susceptibilidad relativa de cada especie animal.⁸¹

Existen efectos teratógenos de la AFB1 principalmente prenatales sobre ciertos animales. Puesto que es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas en células eucarióticas, altera la diferenciación celular. La susceptibilidad a teratógenos varía grandemente durante el curso de la gestación, aunque el embrión es más susceptible durante los estadios tempranos de diferenciación morfológica, datos como estos se muestran en el Cuadro 5.⁸¹

1.7.3 EFECTOS SOBRE AVES DE ENGORDA

Cuadro 5 – Dosis y efecto de AFB sobre el pollo de engorda⁸¹

EDAD DEL POLLITO	DOSIS (Aflatoxina B1)	EFECTO
1 día - 7 semanas	75-65 µg/Kg	Altos – muerte Bajos – inhibición del desarrollo
1-7 días de vida	200 -400 µg/Kg	Inhibición del desarrollo con las concentraciones más bajas, lesiones hepáticas graves y muertes con las concentraciones más altas
1 día -3 semanas	500 µg/Kg	Atraso en crecimiento, hígado graso y aumentado de tamaño.
1 día de vida	250 a 500 µg/Kg	Reducción de la ganancia de peso vivo, cambios macroscópicos en hígado y resistencia a la inmunización contra <i>Pasteurella multocida</i>
1 día-29 días o mas	200 µg/Kg	Susceptibilidad a la coccidiosis (<i>Eimeria tenella</i>), muertes debidas a la coccidiosis. ⁷¹

1.7.3.1 SIGNOS CLÍNICOS

Cuando se trata de intoxicación aguda generalmente la presentación de la enfermedad se da de forma repentina incluso pudiendo llegar a la muerte, al contrario de una intoxicación crónica en donde se pueden observar aves pálidas con pobre pigmentación, pérdida de peso, retardo del crecimiento, elevación de la mortalidad, disminución en la conversión alimenticia, e inmunodepresión (infecciones bacterianas y parasitarias secundarias) en el caso de los aves de postura disminución de huevos por ciclo, fragilidad del cascarón por cambios en el contenido de calcio.²²

1.7.3.2 MORFOPATOLÓGIA

Existen diversas lesiones morfopatológicas que presentan las aves que consumen alimento contaminado con aflatoxinas; uno de los órganos que sufre deterioro es el hígado este macroscópicamente se observa con tonalidades blanco – grisáceo a amarillo – verdoso, al pasar el tiempo desarrolla focos blanquecinos delimitados, existen petequias o equimosis incluso llegando a ser hematomas, atrofia o hipertrofia dependiendo el tiempo de exposición y dosis en algunos casos con focos necróticos.

Bajo microscopio se puede observar degeneración grasa, hiperplasia de conductos biliares, fibrosis peri lobulillar, focos de necrosis, peri hepatitis, hemorragia y congestión multifocal.⁸⁹

Al riñón macroscópicamente se le observan tonalidades blanco amarillentas difusas y microscópicamente muestra necrosis tubular, degeneración grasa, infiltración linfoide la cual puede verse acompañada de calcificación distrófica.⁸⁹

Órganos linfoides como lo es el bazo, bolsa cloacal y timo macroscópicamente son de menor tamaño y tonalidades blanquecinas. Microscópicamente presentan atrofia de bolsa cloacal, timo y bazo con atrofia linfoide.⁷²

Otras lesiones descritas son; cardiomegalia, discondroplasia tibial, atrofia de médula ósea, observándose de color blanquecino y hemorragias en masas musculares (petequias y equimosis). La actividad de los leucocitos y la respuesta inmune también se ven afectadas por la presencia de aflatoxinas. El mecanismo exacto es desconocido, sin embargo el efecto negativo sobre el complemento, interferón, proteínas séricas y actividad leucocitaria son presumiblemente resultado de la lesión hepática y de la inhibición de la síntesis de proteínas.⁹¹

1.7.3.3 HEMATOLOGÍA Y QUÍMICA SANGUÍNEA⁶⁰

A nivel sanguíneo la AFB1 presenta un anillo dicumárinico similar al que presenta la vitamina “K”, por lo que actúa suplantándola y mimetizándola y así ocasionando hemorragias y descenso del hematocrito, se han encontrado porcentajes de hematocrito del 25% en animales suplementados con esta toxina. Se menciona que la concentración de proteína sérica así como el colesterol disminuyen notablemente.^{90,91,92,93}

Los niveles de colesterol, calcio, fósforo, así como la actividad enzimática de la aspartato-aminotransferasa (AST), alanino-aminotransferasa (ALT) se ven notablemente afectados.^{90,91,92,93}

En el cuadro 6 se pueden observar valores normales en analitos sanguíneos de aves sanas (resultados promedio).

Cuadro 6 - Analítos sanguíneos normales. ^{73, 74, 75, 76}

VALORES NORMALES DE ANALITOS SANGUÍNEOS EN AVES		
Hematocrito	27 – 32 %	Dependiendo de la edad en semanas de las aves
Colesterol	100-200 mg/100ml	Promedio aves
Ácidos grasos	360 mg/100ml	Promedio aves
Calcio	15 a 30 mg/100ml	Promedio aves
Fósforo	85-95 mg/100ml	Promedio aves
ALT	1.74-3.75 UI/L	Promedio aves en base edad
AST	184.50-150.13 UI/L	Promedio aves con base en edad
Proteína sérica	3.5-6 g/100ml	Promedio aves

1.8 AFLATOXINAS Y RESPUESTA INMUNE

La aflatoxina B1 tiene los efectos biológicos más potentes dentro de las micotoxinas, su principal mecanismo de acción a nivel celular es la capacidad de unirse al ADN y al ARN celular afectando directa o indirectamente la proliferación y diferenciación continua de las células del sistema linfoide y la síntesis proteica de las células; afecta por ejemplo: la producción de polipéptidos como monocinas, interleucinas y factores del complemento que regulan el sistema inmune y también la síntesis de anticuerpos. Ciertas clases de inmunoglobulinas (IgG y IgA) parecen ser más afectadas que otras.

Los factores séricos y celulares necesarios para una fagocitosis óptima son afectados deteriorando la locomoción espontánea y quimiotáctica de los heterófilos aviares y disminución del conteo de linfocitos T periféricos⁷⁷ al igual que la función fagocítica y presentación antigénica por macrófagos⁷⁸, específicamente de los fagocitos en el sistema retículo endotelial.

En algunos casos se producen efectos histopatológicos significativos y atrofia de los principales órganos del sistema inmune. Las aflatoxinas pueden llegar hasta el embrión comprometiendo el sistema inmune de la progenie, haciéndolos más susceptibles a varios patógenos y una respuesta deficiente a los programas de vacunación, es decir menores títulos de anticuerpos postvacunales.⁷⁹

- *EFFECTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS*

Los análisis de inmunoglobulinas revelaron un impacto de aflatoxina sobre el nivel de IgG e IgA, aunque los niveles de IgM generalmente no se afectan. En animales que consumieron alimento contaminado con aflatoxinas se disminuyó la formación de anticuerpos contra la inyección de células rojas sanguíneas de oveja, se ha reportado una reducción en los títulos de anticuerpos frente a la enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa y enfermedad de la bolsa de Cloacal en gallinas ponedoras alimentadas con 200ppb de aflatoxina.⁸⁰

- *EFFECTOS SOBRE SUSTANCIAS HUMORALES NO ESPECÍFICAS*

Dentro de las acciones importantes de la aflatoxina B1 se encuentra la supresión del cuarto componente del complemento (C4), el cual es necesario para la activación de la vía clásica del sistema del complemento, este sistema es un complejo de ataque a la membrana por actividad hemolítica, lisis bacteriana, etc. Esta disminución parece ser el resultado del efecto de las aflatoxinas sobre las funciones del hígado, así como también sobre la función del macrófago, ambos involucrados en la formación de C4.⁸¹

- *EFFECTOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR CÉLULAS*

La aflatoxina B1 ejerce parte de sus actividades inmunosupresoras a través de la supresión cuantitativa de la producción de linfocinas por parte de las células T. Las aflatoxinas también pueden causar linfocitopenia disminuyendo la concentración de linfocitos T.⁸²

- *ALTERACIÓN DE LA RESISTENCIA A PROCESOS INFECCIOSOS ESPECÍFICOS*

Los efectos del consumo de aflatoxinas sobre la resistencia a infecciones son altamente variables dependiendo de los procesos infecciosos específicos involucrados, la susceptibilidad del hospedante a las aflatoxinas y la interacción del mismo. La resistencia a pasteurelisis en avicultura es definitivamente afectada por las aflatoxinas, aumentan la susceptibilidad o la gravedad de la coccidiosis cecal y de la enfermedad de Marek, de salmonelosis, y al virus de la bursitis infecciosa etc.

DIAGNÓSTICO DE AFLATOXINA

Se puede llegar a él por medio de una historia clínica bien realizada y apoyándose en signos clínicos y pruebas de laboratorio que son de gabinete como: necropsia, histopatología, se deben hacer pruebas de posible toxicidad en el alimento por medio de la utilización de algunas de las técnicas a continuación citadas.^{83, 84, 85, 86, 87,88,89,90.}

1. Cromatografía de líquidos (LC)
2. Cromatografía en capa fina (TLC)
3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
4. Cromatografía de gases (GC)
5. Columnas de inmunoafinidad (análisis inmunoenzimáticos como aflatest)
6. Cromatografía supercrítica de fluidos (SFC)
7. Electroforesis por zona capilar (CZE)
8. Cromatografía de capa a alta presión (OPLC)

1.8.1 PREVENCIÓN

Es claro que la presencia de hongos productores de micotoxinas en los granos y alimentos representa un peligro considerable. Las pérdidas económicas causadas por el rechazo de granos contaminados son considerables. Pero son más importantes las pérdidas no detectadas, debido a la reducción de la productividad en la explotación de animales. El mejor método para disminuir la contaminación de granos con micotoxinas, es la adopción de métodos preventivos para el control de hongos, como son *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium graminearum*. dentro de muchos otros.¹⁰³

Es muy difícil controlar al agente contaminante, el control debe de realizarse desde un punto de vista integrado, tratando o minimizando el efecto negativo de las aflatoxinas

sobre la salud animal, dentro de estas medidas se encuentran la utilización de sustancias ácidas denominados, hepato-protectores, uso de secuestrantes de micotoxinas como son los aluminosilicatos además del uso de probióticos y prebióticos, dentro de estos últimos se encuentran las paredes celulares de levaduras (PCL) tal es el caso de la PCL de *Saccharomyces cerevisiae*.¹⁰³

1.8.2 PROBIÓTICOS

Hace casi un siglo el microbiólogo ruso Ilya Metchnikoff (1895), postulaba que algunas bacterias no son necesariamente perjudiciales para los humanos y los animales que, antes bien, pueden de hecho ser benéficas para su salud y bienestar. Metchnikoff fue pionero que propuso la ingesta de las bacterias contenidas en las leches fermentadas como forma de modular la flora intestinal y así evitar diversas enfermedades y alargar la vida. Sus investigaciones le valieron el Premio Nobel de Medicina en 1907.¹⁰²

Desde entonces, a partir de estas primeras aportaciones, la ciencia ha trabajado para conocer más de los hoy llamados "probióticos" a los que Fuller (1989) definió como "*aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras completas, que son agregados como suplemento en la dieta y que benefician al huésped mejorando el balance microbiano de su flora intestinal*".^{102, 91}

Estos microorganismos ingeridos a través de la alimentación, logran llegar vivos al intestino delgado donde interaccionan con las bacterias de la microflora endógena. Además colonizan el intestino grueso y estabilizan la flora intestinal al adherirse a la mucosa del intestino para impedir la actividad de los microorganismos dañinos, por tanto, estas bacterias ácido lácticas tienen también propiedades inmunomoduladoras en la medida en que estimulan la producción de anticuerpos y refuerzan el sistema inmune.

Se considera un probiótico cuando cumple una serie de requisitos muy específicos:

- Ha de ser inocuo y sus efectos beneficiosos, se suministre solo o junto con antibióticos.
- Los microorganismos activos que lo componen deben sobrevivir al ambiente ácido del estómago, a la presencia de sales biliares y al proceso digestivo.
- Sus componentes deben ser capaces de colonizar el intestino y formar una barrera protectora contra bacterias patógenas como la *Escherichia coli*, la *Salmonella*, el *Staphilococcus* y la *Cándida*, etc.
- Ha de ayudar a metabolizar los carbohidratos y a absorber las vitaminas en el tracto intestinal.
- Debe alterar, equilibrar y fortalecer la flora intestinal al mismo tiempo que estimula las defensas naturales del cuerpo.
- Ha de inducir efectos locales o sistémicos beneficiosos para la salud del huésped, más allá de los meramente nutritivos.
- Debe disminuir y prevenir el riesgo de contraer enfermedades además de mejorar el estado de salud. Pues bien, estos criterios los cumplen básicamente los alimentos que contienen lactobacilos y bifidobacterias, microorganismos procedentes de la fermentación de la leche que se conocen genéricamente como bacterias acidolácticas.¹⁰²

En lo que se refiere a los lactobacilos existen diversas especies que varían enormemente en sus propiedades de adherencia al epitelio intestinal y en sus patrones de colonización, es decir, difieren ampliamente en sus propiedades probióticas o efectos beneficiosos. Entre los más utilizados en la industria alimentaria destacan los lactobacilos *bulgaricus*, *acidophilus*, *casei*, *fermentum* y *plantarum*. Pero además del lactobacilo, otros gérmenes han demostrado potencial terapéutico incluyendo unas pocas especies de *Saccharomyces* además de *Bifidobacterium sp.* Y

Streptococcus thermophilus. La clave está en que logren o no sobrevivir a los efectos de los jugos gástricos y las sales biliares.¹⁰²

En cuanto a la importancia de la actividad de los probióticos cabe decir que los científicos han demostrado su efecto beneficioso en estados patológicos como diarreas, síndrome de colon irritable en humanos, vaginitis, desórdenes inmunológicos, tenesmo, hipercolesterolemia y alergia alimentaria.¹⁰²

1.8.3 PREBIÓTICOS

El término prebióticos fue introducido por Gibson y Roberfroid⁹² definiéndolos como "*ingredientes alimentarios no digeribles de los alimentos, en concreto son carbohidratos de cadena corta que afectan beneficiosamente al huésped, estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad de una o de un limitado grupo de bacterias en el colon y de este modo, mejora la salud del organismo hospedador*". Es decir, se trata de sustancias mayoritariamente de origen vegetal que estimulan el crecimiento y la actividad de las especies bacterianas beneficiosas para el organismo. Además, por el hecho de que no sean digeribles por los jugos gástricos llegan intactas al intestino delgado donde potencian la absorción de los alimentos probióticos, mejoran las funciones de la flora intestinal, regulan sus funciones y hacen aumentar el número de bifidobacterias útiles. Los prebióticos controlan además durante el tránsito intestinal la absorción de grasas por parte del organismo actuando como antimicrobianos y anticancerígenos. También facilita la absorción del calcio y otros minerales además de colaborar activamente en la síntesis de vitaminas del complejo B y de la vitamina K.¹⁰³

Entre los prebióticos destacan sustancias como los oligosacáridos y la inulina, hidratos de carbono de estructura compleja y cadena corta que pasan sin digerir del intestino al colon y son consumidos por las bacterias colónicas.¹⁰³

Por otro lado, estimulan la inmunidad del tubo digestivo para prevenir infecciones intestinales y eliminar las bacterias patógenas y sus toxinas.¹⁰⁴

Así mismo, al modular positivamente la fisiología del tracto gastrointestinal aumentan el peso de las heces y la frecuencia de evacuación intestinal. Por tanto, los prebióticos también encajan en la consideración de alimentos funcionales ya que, además de ayudar a los procesos digestivos, proporcionan ventajas para la homeostasis.¹⁰⁵

1.9 LAS LEVADURAS DE *Saccharomyces cerevisiae* Y SUS APLICACIONES EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene la capacidad de llevar a cabo procesos de fermentación a partir de azúcares hacia CO₂ o etanol, estas características se han ocupado por varios nichos de mercado como lo son la industria panadera y la cervecera principalmente. En la actualidad, se considera que la levadura de *S. cerevisiae* es uno de los microorganismos eucariota más estudiados y estrechamente ligado al progreso de la humanidad, se ha encontrado mecanismos asociados a la levadura, como son las toxinas como *Clostridium*, característica que ha sido aprovechada en terapéutica humana para controlar diarreas ocasionadas por una prolongada medicación con antibióticos por vía oral.^{93,94,95,96}

Las levaduras son capaces de metabolizar y transformar de forma natural minerales inorgánicos en orgánicos, en el caso de que se ingieran levaduras muertas estas aportarán minerales, vitaminas principalmente del complejo B, péptidos, además de considerarse un complemento alimenticio. En la actualidad, células de levadura vivas continúan adicionándose a dietas para animales con la finalidad de mejorar su salud y productividad, sobretodo en el caso de animales rumiantes. Gracias a sus significativas propiedades nutricionales y farmacéuticas, las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* han sido aprobadas como un microorganismo seguro para su empleo y se le ha otorgado el grado de microorganismo seguro o grado GRAS (Generally Recognised As Safe).^{97,98,99,100}

FRACCIONES DE LEVADURAS

Otros subproductos de las levaduras se les conocen como extractos o autolizados dentro de las cuales sobresalen paredes celulares de las levaduras (PCL), estos son obtenidos a partir de la autólisis de la célula completa. Este componente contiene principalmente fuentes de polisacáridos de tipo β -glucanos y mannano-oligosacáridos (MOS), desde el punto de vista alimenticio se han encontrado efectos benéficos en la salud y productividad animal, en algunos casos se ha investigado sobre el efecto de inmuno estimulación bajo condiciones de estrés en algunas especies.^{101, 102, 103}

1.9.1 TIPOS DE FABRICACIÓN DE LEVADURAS

- *FABRICACIÓN INDUSTRIAL DE LEVADURAS*

De forma industrial, cultivos puros de la levadura son producidos específicamente para su uso en la industria cervecera, vinícola, destilería, panadería, doméstico y pecuario. En la industria alimenticia, las formas activas de levadura más predominantes son: como primer lugar, levadura deshidratada con un 95% de materia seca (MS); como segunda, torta de levadura húmeda con un 30% MS; y en menor proporción o como tercera, levadura en forma de crema con 18 a 20% de MS, levadura generalmente utilizada en la industria de panadería.^{9, 10, 104}

A continuación se enunciarán los pasos del proceso de fabricación de levaduras, que puede incluir las siguientes fases:

- 1) Selección, aislamiento y multiplicación celular de los inóculos de levadura a nivel de laboratorio.
- 2) Propagación de la cepa de levadura en el laboratorio (de frascos de 10ml a frascos de 10L), realizada con la finalidad de aumentar la cantidad del producto o inóculo industrial.

- 3) Propagación industrial, se emplean bioreactores o fermentadores aeróbicos de 15 a 200 metros, en donde el objetivo es proveer los nutrientes (oxígeno, nitrógeno y carbohidratos), y las correctas condiciones de temperatura y pH a la levadura para que se multiplique.
- 4) Secado y deshidratado, cuando la concentración de levaduras es adecuada en los fermentadores el caldo de cultivo es centrifugado para formar una crema de levadura, posteriormente la crema se filtra para formar la torta de levadura que es secada a una temperatura adecuada para no destruir su capacidad fermentativa.

9,10,114

- *FABRICACIÓN INDUSTRIAL DE PAREDES CELULARES Y EXTRACTOS DE LEVADURA*

La producción de paredes celulares de levadura se realiza como un paso alterno y posterior a la producción industrial de las levaduras activas, cuando la cantidad de levaduras es la adecuada dentro de los fermentadores, se realiza un proceso térmico que provocara la autólisis de las células de levadura. A partir de aquí, se lleva a cabo un proceso de centrifugación del producto autolisado que provocara la separación de la pared celular y del contenido intracelular (extracto de levadura) de la levadura muerta. Posteriormente los productos separados (pared celular y extracto de levadura) son concentrados y secados cuidadosamente para conservar sus características nutricionales.

9,10,114,105

1.9.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS EXTRACTO DE LEVADURA

Los extractos de levadura, son fuentes ricas en aminoácidos, 5'-nucleótidos, ácido glutámico, vitaminas del complejo B, K, y minerales como son Na, Mg. Por lo que los extractos de levadura son empleados para enriquecer medios de cultivo microbiológicos y optimizar el crecimiento de los microorganismos. Otra importante aplicación de los extractos de levadura, la encontramos en la industria alimenticia donde generalmente son utilizados para potenciar el sabor de los alimentos.^{9,10,114, 105, 106}

1.9.3 PARED CELULAR

- *Características de la PCL*

Existe un reciente interés por las paredes celulares por sus propiedades de composición es así que sus dos moléculas pueden mostrar efectos benéficos en los animales y humanos. No obstante, las concentraciones de estos polisacáridos se verán modificados por circunstancias como son los procesos de producción de la misma levadura así como su proceso en general. Por otro lado, las principales funciones de la pared celular están encaminadas a garantizar la supervivencia de la célula, entre estas se pueden incluir las siguientes: mantiene las condiciones de estabilidad osmótica dentro la célula, brinda protección ante condiciones de estrés físico, mantiene la integridad y la forma celular durante los procesos de crecimiento y división, limita la permeabilidad de macromoléculas a través de la pared celular y la blinda del ataque de proteínas externas; evita el escape hacia el medio externo de moléculas solubles intermediaras durante la construcción de la pared celular, y crea los micro-ambientes internos adecuados para la membrana celular durante las fases de estancamiento de los cultivos y colonias.^{107, 108, 109,}

110

- *Composición de la PCL*

Estudios realizados con levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* sugieren que dependiendo de las condiciones de crecimiento, la pared celular de la levadura puede representar de un 10 a un 25% del total de la MS de la célula¹¹¹. En estudios más recientes donde fueron evaluadas diferentes especies de levaduras, se encontraron valores de porcentajes de MS de pared celular de un 26 al 32%, observándose diferencias de acuerdo a la especie de levadura¹¹². Se ha estimado que el porcentaje de polisacáridos que puede contener la pared celular de la levadura puede ser de alrededor de un 85 a un 90%, y de un 10 a un 15% de proteínas. A escala estructural, la pared celular de la levadura esta constituidas por 3 grupos de polisacáridos: 1) polímeros de manosa o manano-proteínas, hasta un 50% de la MS de la PCL; polímeros de glucosa o β -glucanos (1,3/1,6), hasta un 55% de la MS de PCL, y en menor proporción polímeros de N-acetil-glucosamina o quitina en un 6% de la MS de PCL.¹¹³

Puede considerarse que aunque la construcción de la pared celular de la levadura es firmemente controlada por la levadura, la composición (polisacáridos), estructura y grosor, dependen en gran magnitud de las condiciones medioambientales impuestas dentro de los fermentadores³, del ciclo de vida de la célula¹¹⁴ y de la cepa de origen. De hecho, cuando las células de levaduras son sometidas a variaciones drásticas en los parámetros de fermentación dentro de los fermentadores, como respuesta a este estrés la levadura incrementa las proporciones de quitina a escala de la pared celular.³

- *Estructura de la PCL*

Los polisacáridos que constituyen la PCL, corresponden a moléculas de 1,3- β -glucanos, 1,6- β -glucanos, manano proteínas y quitina, todos ellos con diferentes grados de polimerización, tamaño o peso molecular, y porcentajes dentro de la pared; la capa

interna de la pared celular la componen moléculas de 1,3- β -glucanos moderadamente ramificados unidos por puentes de hidrógeno, que le proporcionan elasticidad a la red tridimensional que sirve de soporte a la capa externa constituida principalmente por manano-proteínas, o capa protectora que se extienden hacia el medio externo de la célula⁴. La gran elasticidad de la pared celular puede ser ejemplificada cuando se transfiere a la levadura a una solución hipertónica, observándose que la célula se encoje rápidamente llegando a perder más de un 60% de su volumen, que le representaría una pérdida en su superficie de un 40 a un 60% no obstante, este proceso es revertido cuando la levadura se transfiere a su medio original de forma general¹¹⁵, la conjunción de las 4 macromoléculas dentro de la pared celular de la levadura ocurre de la siguiente manera: la porción proteica de la manano-proteína (100kDa aprox.) se une a la macromolécula de 1, 6- β -Glucano por medio de anclajes de tipo glicosilfosfatidilinositol que contienen 5 residuos de ligaduras α - manosil; la macromolécula de 1, 6- β -Glucano a su vez presenta ramificaciones con enlaces β (1, 3), a escala de estas ramificaciones la quitina puede unirse a ella por medio de enlaces β (1, 4) y β (1, 2); y finalmente, la porción terminal reducida del 1, 6- β -Glucano se conecta con la porción terminal no-reducida de la glucosa terminal del 1, 3- β -Glucano.¹¹⁶

1.9.4 UTILIZACIÓN DE LEVADURAS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

Las mejoras observadas en la productividad y salud de los animales que consumen levaduras podrían estar asociadas a efectos de tipo directo e indirecto. Como efectos directos están los de tipo nutricional y en concreto a los ejercidos por los diversos nutrientes presentes en las células de levadura como proteínas, minerales, vitaminas, aminoácidos y péptidos, que pueden ser utilizados por el individuo cuando la levadura muere. Otra hipótesis planteada, es la capacidad que presenta la levadura para producir numerosas enzimas (proteasas, peptidasas, invertasas, hidrolasas, maltasas, fosfatasas, galactosidasas, etc.), algunas de ellas pueden ser liberadas en el intestino y reforzar la

acción de las enzimas endógenas, facilitando la digestión de la materia seca del alimento. Aparentemente, este mecanismo podría brindar mayores beneficios en animales rumiantes (por su dependencia de la digestión fermentativa) ya que en el caso de animales monogástricos (ave y cerdo) no más del 30% de la energía neta para mantenimiento proviene de los productos de la fermentación, y además en estas especies la composición de las dietas no impone una dependencia importante de la digestión fermentativa.¹²⁹

Trabajos sugieren que los beneficios tipo nutricional y no nutricional que la levadura de *Saccharomyces* puede ejercer en la salud del animal, incluyen efectos diversos que van desde la modificación de la digestibilidad de nutrientes o MS, desarrollo de la mucosa digestiva, reducción de la colonización digestiva por bacterias patógenas como *Salmonella*, contrarrestar los efectos adversos de las micotoxinas y la modificación de la respuesta inmunitaria. En el caso concreto de la utilización de levaduras en dietas para pollos de engorda, se presentan estudios realizados en este tipo de animales alimentados con levaduras. De forma global, la utilización de levaduras en la dieta representó beneficios de >3.3% en promedio en el peso vivo del pollo con respecto a las aves alimentadas con dietas sin levaduras. No obstante, de estos resultados, también puede observarse que la mitad del total de estudios reportados, los efectos en el crecimiento de las aves por parte de la levadura no fueron estadísticamente consistentes. Por otro lado, la aplicación de las levaduras en el alimento de las aves también muestra variaciones, en algunos estudios las levaduras fueron adicionadas en combinación con bacterias probióticas como *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bacillus* sin obtenerse un claro efecto sinérgico. Otro aspecto importante observado en estos estudios fue una gran variación en las dosis incluidas en las dietas o alimentos de las aves, observándose dosificaciones desde 100g hasta 4kg por tonelada de alimento.^{130,117}

1.9.5 UTILIZACIÓN DE PAREDES CELULARES DE LEVADURA, MOS Y β -GLUCANOS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

Las PCL son fuentes ricas de polisacáridos naturales del tipo β -glucanos y manano-oligosacáridos (MOS). Investigaciones en el área de carbohidratos o polisacáridos (Glicómica), sugieren que este tipo de moléculas cumplen funciones vitales en los procesos de comunicación a escala intestinal y del sistema inmunitario.^{118,119} En el caso concreto de las PCL, productos derivados de levaduras de *S. cerevisiae* y que frecuentemente son definidos como fuentes de polisacáridos naturales de tipo MOS, su utilización en avicultura como aditivos alimenticios se remonta a inicios de los 90.¹²⁰ De acuerdo a Rosen¹²¹ hasta la fecha los beneficios observados en la productividad animal por la suplementación de MOS en la dieta, muestran ser similares a los obtenidos con antibióticos promotores del crecimiento (APC); esta situación podría sugerir que este tipo de aditivos pueden representar una buena herramienta para incrementar la eficiencia productiva del ave cuando los APC no estén presentes en alimento¹²². La suplementación de MOS en dietas para cerdos y aves, ha reportado beneficios en términos de mejora en los parámetros productivos y de la salud del animal.^{123,124}

Una de las principales empresas que comercializa este tipo de nuevos aditivos o específicamente MOS, ha realizado una serie de análisis estadísticos globales (meta-análisis) incluyendo pruebas realizadas en distintas especies, bajo diferentes condiciones experimentales y países.¹²⁵ En 14 de los 17 ensayos analizados, la incorporación de MOS en dietas para lechones en la fase de destete proporcionaba efectos similares a los APC en cuanto a crecimiento y eficiencia alimenticia.¹²³ Se ha evaluado conjuntamente 29 pruebas realizadas con la utilización de MOS en dietas de pollos de engorda. Los resultados de este análisis global muestra que la utilización de MOS en pienso representó mejoras respecto a los controles negativos (sin MOS) de +1.61% en el peso vivo, y 1.99 en el índice de conversión alimenticia y de 21.4% para la mortalidad. En pollos de engorda que consumieron MOS en la dieta, los efectos generales observados por la utilización de MOS incluyen: mejoras en los índices productivos, mayor resistencia ante infecciones bacterianas y coccidias, menores mortalidades y modificación de la deposición de grasa

abdominal en los pollos. De estos estudios, Waldroup et al 2003¹²⁶, utilizando dosis de 1.0 Kg/Ton de alimento durante 42 días, no encontraron efectos en las variables productivas y de la calidad de la canal así como en conversión del alimento. Cabe destacar que la mayoría de estos estudios fueron realizados con el empleo de dietas elaboradas con maíz y pasta de soya, utilizando distintas dosis de MOS en el alimento, mayores en las fases de iniciales (0-14 y 0-21 días) y menores en las fases finales (más de 21 días). De forma similar a los estudios con levadura en pollos, en estos trabajos fueron observados diferencias en las dosificaciones del mismo producto en los distintos estudios, utilización de MOS en combinación con otro tipo de aditivos como bacterias lácticas o sulfato de Cu, y pocos estudios con el uso de dietas viscosas o que emplearan cereales como trigo, cebada o centeno. Los efectos observados en pavos incluyen la modificación de las poblaciones bacterianas, ácidos grasos volátiles y menor colonización de bacterias patógenas como *E. coli* y *Clostridium* a nivel de los ciegos, además de efectos favorables en el índice de conversión alimenticia y peso vivo de estos animales. En gallinas de postura, la utilización de MOS representó, una mayor productividad y mejora de la calidad del huevo (unidades Haugh). En una situación similar a los estudios previos con MOS en pollos de engorda, todos los estudios en pavos y el de gallinas fueron realizados con dietas elaboradas con maíz y soya, observándose diferentes dosificaciones de MOS en las dietas empleadas en pavos.^{129,130}

1.9.6 PRINCIPALES VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL EMPLEO DE FRACCIONES DE PCL

Algunas de las ventajas de la utilización de productos basados en polisacáridos de PCL, son su gran capacidad para soportar las altas temperaturas que pueden ocurrir en los procesos de peletizado del alimento de monogástricos, además de una gran capacidad para resistir las condiciones químicas y físicas impuestas durante su trayectoria por el tracto digestivo del animal.^{127,128} Por otro lado, buena parte de la investigación generada acerca del empleo de polisacáridos provenientes de PCL en dietas para animales,

enfatan más en las propiedades de las fracciones de manano-oligosacáridos o MOS cuando esta fracción representa la segunda en importancia dentro de la pared celular, después de la fracción de β -glucanos.¹²⁹ De esta forma, una menor cantidad de estudios son reportados sobre las propiedades de la PCL como estructura completa, o en su caso sobre el empleo de fracciones de β -glucanos. De las fracciones de β -glucanos, la mayor parte de la investigación generada sobre sus mecanismos de acción o ventajas de su utilización, son con modelos de estudio en humanos y roedores; de forma concreta en el sector acuícola.¹³⁰ Actualmente, continúa existiendo un desconocimiento sobre el proceso de origen y de las características de los productos elaborados con fracciones de PCL.¹³⁴

1.10 EXCLUSIÓN DE PATÓGENOS

1.10.1 EXCLUSIÓN DE BACTERIAS FIMBRIA-1 ESPECÍFICAS

El proceso de colonización del tracto digestivo por microorganismos potencialmente patógenos, se lleva a cabo gracias al empleo de un grupo de proteínas y glicoproteínas bacterianas de superficie denominadas “lectinas”. Las lectinas son glicoproteínas que se caracterizan por tener la capacidad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos de forma libre o que constituyen estructuras más complejas. De tal forma, microorganismos como *Salmonella*, *Escherichia coli* o *Vibrio cholerae* que presentan fimbrias tipo-1, utilizan lectinas con afinidad por la manosa con el fin de unirse a ciertos carbohidratos de superficie localizados en las células epiteliales de la mucosa digestiva, para fijarse y colonizar la mucosa digestiva.¹³¹

Estudios realizados con la utilización de manano-oligosacáridos o MOS derivados de PCL, y de células de *Saccharomyces* suministrados por vía digestiva a aves, muestran ser una buena alternativa para reducir la prevalencia de colonización del ciego de pollos por cepas de *Salmonella enteritidis*^{132,133,134}; parte de los mecanismos de acción que han sido descritos para justificar el efecto de exclusión de patógenos que pueden ejercer las levaduras y las PCL sobre bacterias patógenas, parten del estudio de la sensibilidad de las fracciones D-manosa y metil- α -Dmanosido para unirse a las lectinas afines a receptores presentes en cierto tipo de bacterias que presentan fimbrias tipo-1.¹³⁵

En estos estudios, se ha reportado que las fracciones D-manosa y metil-alfa-D-manósido pueden ejercer un efecto de inhibición, mayor a un 90%, de la adherencia de *Salmonella typhimurium* a las células digestivas epiteliales de pollos de un día de edad. Posteriormente, estos estudios fueron validados en aves a los cuales se les suministró *Salmonella typhimurium* en el agua de bebida con y sin fracciones de D-manosa. Los resultados mostraron que la utilización de D-manosa redujo el porcentaje de pollos

colonizados con *Salmonella typhimurium* de 78% a 28%, de 82% a 21% y de 93% a 43%, en tres experimentos respectivamente.¹³⁶; no obstante, debido al alto costo de las fracciones de D-manosa, su utilización en condiciones comerciales podría ser prohibitiva, incluso bajo periodos cortos de administración.¹³⁷ Con la utilización de paredes celulares de levadura, Spring et al (2000) encontraron una reducción en la colonización de *Salmonella* en el ciego de 89.8 a 55.7% en los tratamientos controles y en los tratamientos con PCL respectivamente. En una serie de estudios, observaron que gallinas alimentadas con fracciones de MOS mostraban un incremento en las poblaciones de bacterias del ciego correspondientes a *Bifidobacterium spp* y *Lactobacillus spp*, y una disminución de Enterobacterias. Posteriormente, el contenido cecal (CC) de estas gallinas fue proporcionado a pollos de engorda como un producto de exclusión competitiva, observándose que aquellos pollos que consumieron CC de aves suplementadas con MOS fueron menos susceptibles a ser colonizados con *S. enteritidis*.^{138,139}

1.10.2 ABSORCIÓN DE MICOTOXINAS

La estructura química de las PCL de *S. cerevisiae* no solo exhibe un alto grado de antigenicidad debida a sus fracciones de β -glucanos y manosa. En estudios recientes (*in vitro*), se ha sugerido que esta estructura tridimensional constituida principalmente por polisacáridos, es capaz de llevar a cabo reacciones de absorción para ciertas micotoxinas de tipo, aflatoxina, zearalenona y ocratoxina.^{140, 141} Las micotoxinas son un grupo diverso de compuestos químicos tóxicos (metabolitos secundarios) producidos por una gran variedad de hongos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* y *Alternaria*). Debido a que los hongos contaminan los cereales frecuentemente en la mayor parte de los países, la presencia de micotoxinas en materias primas y alimentos para animales también llega a ser frecuente.^{142, 143} Algunos ejemplos de micotoxinas identificadas en materias primas y alimentos contaminados de forma natural empleados en avicultura son: aflatoxinas (AF), ocratoxinas (OA), zearalenona, toxina T-2, vomitotoxina y fumonisina, de forma general la intoxicación por micotoxinas puede representar efectos en la salud y productividad del

individuo a distintos niveles, por ejemplo: efectos hepatotóxicos, nefrotóxicos, inmunosupresores, hepatocarcinógenos, teratogénos y mutagénos.¹⁴⁴

En alimentación de aves, los resultados positivos encontrados en modelos *in vitro* para las PCL como absorbente de micotoxinas coinciden con los estudios *in vivo* en pollos de engorda, en los cuales las levaduras de *S. cerevisiae*¹⁴⁵ y PCL¹⁴⁶ fueron capaces de contrarrestar los efectos tóxicos de piensos contaminados con aflatoxinas suministrados a las aves. En otros estudios realizados con gallinas reproductoras de estirpe pesada se observó una reducción en la productividad (postura, incubabilidad y mayor mortalidad embrionaria) cuando las gallinas consumían piensos contaminados con AF no obstante,¹⁴⁷ cuando se les incorporaban PCL a los piensos contaminados, las aves mostraban una recuperación parcial de los parámetros de productividad. En un estudio más reciente Zaghini et al. (2005)¹⁴⁸, encontraron que la suplementación de MOS a piensos contaminados con AF, resultaba en una reducción en la concentración de metabolitos de aflatoxinas (AF-B1) en el hígado de gallinas alimentadas con estos piensos contaminados. De manera general, los glucomananos adicionados al alimento de pollos de engorda a dosis de 0.5 a 1.0 kg por tonelada, mostraron ser capaces de contrarrestar los efectos negativos de piensos contaminados con micotoxinas (AF, OA y T-2) sobre la productividad y órganos como el riñón, hígado, bolsa cloacal, timo y bazo de los pollos. Se encontraron que los glucomananos adicionados en el alimento contaminado con AF y proporcionado a las aves, eran capaces de reducir la absorción de la AF a escala digestiva. En el caso de gallinas de postura, los glucomananos adicionados a 2 kg por tonelada de alimento mostraron resultados favorables sobre el control de los efectos adversos de piensos contaminados con micotoxinas como zeralenona y deoxinivalenol.¹⁴⁹

1.11 PIGMENTOS

En la industria avícola, uno de los problemas de importancia económica, es la pigmentación de la piel y tarsos del pollo; ya que la apariencia visual, especialmente el color, es una característica importante de los alimentos y determina la elección o el rechazo del producto por el consumidor. Esto también ocurre en los productos avícolas, en los cuales el color de la piel juega un rol fundamental para la comercialización y aceptación del producto. Debido a lo anterior, los productores adicionan pigmentos a la dieta del pollo para mejorar su presentación. Uno de los problemas cuando se presenta un problema de salud en la parvada o micotoxinas en el alimento al finalizar el ciclo productivo del pollo es no alcanzar la pigmentación cutánea que exige el mercado. Por lo que el objetivo de ese estudio, fue la administración de pigmento en el último tercio de vida pollo, para lograr alcanzar la pigmentación de la piel.¹⁵⁰

Las aflatoxinas provocan poca implantación de pigmento en piel dado que no se favorece la absorción en tracto intestinal.

2.0 JUSTIFICACIÓN

Dado que en la producción avícola la alimentación constituye el 70% del gasto total de producción y que en la elaboración de alimentos balanceados se utilizan granos y cereales forrajeros, esto constituye un riesgo, ya que es prácticamente imposible encontrarlos libres de micotoxinas, siendo de importancia para la salud animal y humana primordialmente a las aflatoxinas. Por lo que es indispensable seguir investigando métodos de control que minimicen los efectos negativos de estas aflatoxinas sobre las variables productivas (ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia), así como alteraciones morfológicas y que al mismo tiempo tengan un efecto inmunomodulador es por ello que el uso de productos como las paredes celulares se están utilizando para que contrarresten los efectos negativos de las aflatoxinas ya que la salud del ave se ve afectada y por ende la producción avícola de forma general, por lo tanto las paredes celulares de levadura brindan mejoras en la producción y salud aviar.

3.0 HIPÓTESIS

El uso de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL 0.5 y 1.0 Kg/Ton) disminuye los efectos negativos sobre las variables productivas, química sanguínea, inmunidad y lesiones morfológicas ocasionadas por la ingesta de alimento con aflatoxina B1 y B2 en contenidos de 100, 200 y 3000 µg/Kg en el pollo de engorda.

4.0 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un prebiótico comercial a base de pared celular levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL 0.5 y 1.0 Kg/Ton), en presencia de aflatoxinas (AFB1 y AFB2 100, 200, 300 µg/t) así como evaluar peso, consumo de alimento, conversión alimenticia salud intestinal, hematología, química sanguínea, e inmunidad en el pollo de engorda durante un periodo de 49 días.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el desempeño productivo en pollos de engorda suplementados con pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL) a dos dosis de 0.5 Kg/Ton y 1.0 Kg/Ton, así como aflatoxina B (AFB1 y AFB2) en contenidos de 100, 200 Y 300 µg/Kg.
- Evaluar los cambios morfológicos macroscópicas y microscópicas a nivel intestinal, hígado, riñón, bazo, bolsa cloacal, en pollos de engorda que consumen PCL (0.5 y 1.0 Kg/Ton) desafiados con alimento contaminado con AFB1 y AFB2 (100, 200 Y 300 µg/Kg).
- Evaluar el hematocrito y bioquímica sanguínea, en pollos de engorda que consumen PCL (0.5 y 1.0 Kg/Ton) desafiados con alimento contaminado con AFB1 y AFB2 (100, 200 Y 300 µg/Kg).
- Evaluar la pigmentación de los animales que consumieron alimento contaminado con AFB1 y 2 100, 200 Y 300 µg/Kg y PCL 0.5 y 1.0 Kg/Ton al finalizar el ciclo productivo de 49 días.
- Evaluar la respuesta vacunal contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con AFB1 y 2 100, 200 Y 300 µg/Kg y PCL 0.5 y 1.0 Kg/Ton.
- Evaluar la respuesta inmune celular en pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con AFB1 y 2 100, 200 Y 300 µg/Kg y PCL 0.5 y 1.0 Kg/Ton

5.0 MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, de la Universidad Nacional Autónoma de México (19° 40' 50" (19.65682), 99° 12' 25" (-99.20953) altura promedio de 2,252 msnm.

5.1 PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS

La producción de las aflatoxinas se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Asimilación Tecnológica CAT Campus 3 (Universidad Nacional Autónoma De México)

1. Se empleó maíz amarillo catalogado como Puebla el cual se sometió a un proceso de limpieza manual con la finalidad de quitar aquellos granos que pudieran estar rotos, pigmentados o sucios, ya que estas características dan la posibilidad de ser granos con contaminación bacteriana y/o fúngica; posteriormente se evaluó la presencia de aflatoxinas totales por medio de columnas de inmunoafinidad (método 991.31 de la AOAC) marca VICAM-AFLATEST.¹⁵¹
2. Se inocularon 32 kilos de maíz con una cepa de *Aspergillus flavus*^{152,153} obtenida de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, identificada con el número de cepa #28 productora de AFB1 y AFB2. Se preparó una suspensión de esporas, a una concentración de 1, 556, 000/10ml y esta se aforó a 100 ml.
3. Se analizó la humedad del maíz con un determinador de humedad Motomco 919, se obtuvo un resultado de 12% de humedad. La humedad se ajustó a 19% para favorecer el crecimiento del hongo.

$$\text{Contenido de Humedad (CH)} = \frac{100 - \text{CH inicial}}{100 - \text{CH deseado } 19\%} = 158.25 \text{ ml}$$

Una vez determinada la Humedad al 19% se hizo una solución de 400 ml de solución con esporas para cada 1.5 Kg. de maíz.¹⁵⁴

4. El tiempo de incubación fue de 39 días ajustado a una temperatura promedio de 27 °C y humedad relativa del >19 %.^{151,154}
5. Se llegó a los 39 y el contenido final de 25000 µg de AFB/Kg de alimento, en un total de 32 kilogramos de maíz, una vez alcanzado el contenido se esterilizó el alimento para inactivar al hongo y las esporas viables y con esto preservar solamente la toxina.¹⁵⁴
6. Se realizó determinación de AFB totales para conocer los contenidos homogéneos del alimento, para la realización de la evaluación de los contenidos de aflatoxinas se siguió la metodología indicada por método 991.31 de la AOAC, se utilizó la marca VICAM-AFLATEST.¹⁵¹
7. Se utilizó una mezcladora mecánica con cintas de acero (modelo Mix 20, con capacidad de 20 kg) para ajustar contenido de aflatoxinas a 100, 200 y 300 µg/Kg de alimento.

5.2 PAREDES CELULARES DE *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó el producto comercial Safmannan® que es utilizado como complemento nutricional prebiótico para animales. Es una fuente purificada de manano-oligosacáridos (MOS) y β -glucanos obtenidos de una levadura primaria inactivada (*Saccharomyces cerevisiae*) para su uso en alimentos para animales, la cual está constituida por¹⁵⁵:

β -glucanos	24% mín.
Mananos	22% mín.
Proteínas	14% mín.
Materia seca	97% mín.

Se adicionaron al alimento, tres concentraciones de PCL (SAFFMANAN) 0.0, 0.5 y 1.0 Kg/Ton, en tres repeticiones.

5.3 CASETA DE PRODUCCIÓN AVÍCOLA

El experimento se desarrolló en la caseta experimental de aves ubicada en F.E.S. Cuautitlán, se instalaron:

- Cortinas de poliuretano transparente con filtro UV en disposición zootécnico de túnel de 2 vías, (para mantener la temperatura interna de la caseta), así como para manejar la ventilación de la misma.
- 60 corraletas plásticas para lotificar a las aves. Cada corraleta se ajustaba a un área aproximada de 1.20 m². El espacio mínimo requerido por cada 10 aves es de 1 m².
156
- 60 bebederos con una capacidad de un galón durante las primeras 2 semanas del experimento.
- 60 bebederos de campanas con dosificador automático para cada uno de los tratamientos, este se utilizó después de las primeras 2 semanas del experimento.
- 60 comederos chick feeder durante las primeras 2 semanas del experimento.

- 60 comederos tipo tolva de 5 kg después de las primeras 2 semanas del experimento.
- La cama de los lotes fue de viruta de madera mediana.
- 3 campañas de difusión de calor por medio de combustión de gas marca PSI 10 kw LP modelo 134 y con una temperatura de 31 a 33 ° C y se fue disminuyendo progresivamente en un periodo de 3 semanas hasta llegar a 21 ° C.
- Tapetes sanitarios a cada entrada de la caseta (área negra, gris y blanca), y una más para ingreso al área de la lotificación; los tapetes contenían cuaternarios de amonio al 20% (cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, cloruro de cetilpiridinio, cetrimida).

Todo lo antes mencionado pasó por limpieza y desinfección con cuaternarios de amonio (cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, cloruro de cetilpiridinio, cetrimida) este se utilizó al 10%.

Se utilizó un total de 1.8 toneladas de alimento balanceado en migaja marca nutrición técnica animal, formulas alimenticias para ave de engorda, iniciador y finalización sin ninguna fórmula de enriquecimiento alimenticio tal se muestran:

Componente	Iniciador	Finalización
Proteína (g/100g)	29.35	18.26
Cenizas (g/100g)	5.69	5.95
Humedad (g/100g)	8.27	91.81
Solidos Totales (g/100g)	91.73	8.19
Grasa (g/100)	5.12	4.66
CHOS(g/100g) Diferencia	43.3	54.75
Fibra % max	2.7	4

5.4 VARIABLES PRODUCTIVAS

Se realizó manejo zootécnico comúnmente utilizado en las explotaciones comerciales de pollo de engorda en México de aves de 49 días; el cual consiste en rondines cada hora para checar que no existieran anomalías en comederos, bebederos, campanas de dispersión de calor, recoger mortalidad si existieran.

Se marcaron a las aves con anillos plásticos en patas hasta las primeras 3 semanas y más adelante se pigmentaron alas con pigmento no tóxico base aceite, para diferenciar y marcar a cada una de las aves.

Para la lectura y registro de las variables productivas como son:

- a) Peso vivo corporal, se realizó de manera individual semanal y acumulado.
- b) Consumo de alimento semanal y final
- c) Índice de conversión alimenticia (I.C) acumulada.

Se utilizó una báscula digital Torrey PCR comercial, donde se realizó el pesaje individual de los pollos semanalmente; así como registros semanales de gramos de consumo de alimento y gramos de alimento rechazado por semana por cada corraleta hasta el final del experimento.

Para saber el consumo por semana se realizó el cálculo diferencial entre el alimento ofrecido y el alimento rechazado.¹⁵⁷

El cálculo de conversión alimenticia se llevó a cabo de la siguiente manera:

$$\text{Conversión alimenticia} = \frac{\text{Kg de alimento consumido}}{\text{Kg de peso vivo}}$$

Se hizo el comparativo con el manual Ross y con el grupo control.¹⁵⁸

5.5 VACUNACIÓN

Se utilizó una vacuna de Newcastle:

- *COMPOSICION:* La vacuna de Newcastle virus vivo cepa La Sota o B1 liofilizada es desarrollada en embrión de pollo SPF, bajo las más estrictas normas de control de calidad y técnicas más modernas de fabricación que maximizan y garantizan la integridad de los antígenos.¹⁵⁹
- *USO EN:* Aves.
- *DESCRIPCION:* sólida, segura y confiable: la vacuna contra la enfermedad de Newcastle cepa La Sota o B1 de Maver contiene títulos los cuales se reflejan en gran protección de las aves contra esta enfermedad (no menos de 10^9). Es una vacuna que no revierte a estados patógenos por el tipo de cepa que se utiliza, sin embargo, confiere protección sólida contra la enfermedad de Newcastle incluso en zonas de alta incidencia o recurrencia.
- *INDICACIONES:* Está indicada para la prevención y control de la enfermedad de Newcastle (Paramixovirus) en aves sanas a partir de la primera semana de edad. La vacuna de virus vivo de administración ocular, confiere protección a nivel traqueal, produce anticuerpos del tipo IgA secretor, protegiendo la vía de entrada natural del virus al organismo.
- *DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION:* Instilación ocular: Una gota en el ojo por ave.
- *ADVERTENCIAS:* Manténgase en refrigeración entre 2 a 7°C. Evite que el producto se congele. No se exponga a la luz solar. Una vez preparado el producto utilícelo en su totalidad a la brevedad.
- *PRESENTACIONES:* Frascos con 25, 50, 100, 500 y 1,000 dosis de Vacuna virus vivo liofilizada contra la enfermedad de NEW-CASTLE (Paramixovirus) cepa La sota o B1.

La aplicación de la vacuna fue el día 7 y 35; la vía de administración fue una gota vía intraocular a cada uno de los pollos de los diferentes tratamientos.

5.6 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE Y OBTENSIÓN DE SUERO

La toma de muestras sanguíneas se realizó 3 veces, esta se realizó por la técnica de punción directa a corazón. La sangre se utilizó para determinación de proteínas plasmáticas, hematocrito y transaminasas hepáticas.

5.6.1 MATERIALES

- 5 cajas de tubo Vacutainer Becton Dickinson Tapón rojo convencional, volumen de drenado 3 ml
- 2 cajas de jeringa hipodérmica convencional volumen 5 ml
- 1 caja de jeringa hipodérmica 1 ml
- 2 tubos de 100 pipetas capilares
- Tubos capilar translúcido con EDTA K₂ tapón lila cbss: 080.909.5599, Volumen 250-500 MCL
- Micro centrifuga 5,000 rpm (Clay Adams AU1)
- 1 frasco de heparina sódica 25,000 UI
- Gradillas
- Mechero de bunsen
- Lector de micro hematocrito SolBac Modelo L-10
- Refractómetro Atago ATC-S/Mill-E
- 1000 viales de cristal para conservación de suero

5.6.2 METODO

Para obtener la sangre de los animales, se utilizó la técnica de sujeción y toma de muestras sanguíneas en aves como lo describe Valdivia, 2008.¹⁶¹

Se realizó por punción cardíaca, obteniendo un volumen total de aproximadamente 2 ml.

Para la primera toma de muestra se obtuvieron 2 ml de sangre, de este volumen total se vertieron en 2 diferentes tubos de vacutainer; uno de ellos con heparina y el otro sin heparina; el tubo con heparina se mantuvo en movimiento suave a manera de círculos

para mezclar la heparina con la sangre y evitar así el proceso de coagulación; el siguiente tubo de colocó en ángulo de 45 grados para dejar que a temperatura ambiente se formara el coagulo, posteriormente se colocaron estos tubos en la centrifuga a 15000 gravedades para que se formara más compacto el coagulo y así pudiese obtener suero en mayor cantidad.

Para la siguiente toma de muestras el volumen final fue 4 ml y de esto se tomaron 1.5 ml para hematocrito y 2.5 ml para obtención de suero.¹⁶¹

Ya obtenidas las muestras se colocaron en frascos limpios y estériles, para su conservación se refrigeraron muestras de sangre completa a 4 ° C y el suero se llevo a congelación hasta - 3 ° C.¹⁶⁰

- **HEMATOCRITO**

Para la lectura se utilizaron capilares que fueron sellados con fuego y posteriormente centrifugar a 1.5 g por 5 min, posterior a ello se realizó lectura con un platillo lector de micro hematocrito.¹⁶⁰

- **PROTEÍNAS TOTALES**

Una vez que se obtuvo el capilar con la separación de cada uno de los paquetes (blanco, rojo) se hace lectura en el espectrómetro y su absorbancia se traslada a (g/L).¹⁶¹

- **ALBÚMINA**

Para la elaboración de la lectura de albumina se utilizó la técnica descrita por el laboratorio Wiener-Lab.¹⁶²

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

A) PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS
 Reactivos listos para uso

B) PROCEDIMIENTO

1. Pipetar en tubos de ensayo:

	Blanco	Patrón	Muestra
STD	-	5 µL	-
Muestra	-	-	5 µL
R1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

2. Mezclar bien y cuidadosamente y mantener los tubos durante 10 minutos en temperatura de 10 a 30 °C.
 3. Medir la absorbancia del Patrón y de la Muestra frente al Blanco a 630 nm (620 - 640). El color es estable durante 30 minutos.

PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN/CÁLCULOS

Albúmina (g/dL) = $\frac{\text{Absorbancia de la Muestra}}{\text{Absorbancia del Patrón}} \times \text{Concentración Patrón (g/dL)}$

Ejemplo:

Concentración del Patrón = 4 g/dL
 Absorbancia de la Muestra = 0,280
 Absorbancia del Patrón = 0,360
 Albúmina (g/dL) = $\frac{0,280}{0,360} \times 4 = 3,11$ g/dL

5.7 DETERMINACIÓN DE TÍTULOS DE ANTICUERPOS

Se realizó separación y conservación de suero para realizar pruebas de titulación de anticuerpos vacunales Enfermedad Viral de Newcastle), utilizando la prueba con la técnica de Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación.¹⁶³

5.7.1 MATERIAL

- 10 Placas fondo en U
- Solución PBS
- Pipetas
- Platina de calor
- Gradillas
- Tubos de ensaye volumen 5 ml
- Matraz aforado 10 ml
- Matraz aforado 50 ml
- Matraz aforado 100 ml
- Pipetas 1 mm
- Pipetas 5 mm
- Pipetas 10 mm
- Bullas para pipetas
- 1 Cronometro
- Multipipetas INTECH 0.2 -50 µL
- Micropipeta 50-100 µl
- Vacuna virus vivo liofilizada contra la enfermedad de **NEW-CASTLE** (*Paramixovirus*) cepa La sota o B1.

5.7.2 METODO

La técnica de Hemoaglutinación en microplaca (HE) e inhibición de la hemoaglutinación en microplaca (HI) se basaron en las técnicas descritas por cita .^{167,164}

Hemoaglutinación

1. Colocar a lo largo de dos filas de la microplaca una gota de PBS de 0,05 ml, excepto en el primer orificio.
2. Colocar una gota de la suspensión viral 0,050 ml en el primer y segundo orificio.
3. Hacer diluciones dobles seriadas y constantes con un pipeta de 0,05 ml, a partir del segundo orificio hasta el penúltimo.
4. Agregar 0,050 ml de glóbulos rojos de ave, lavados y diluidos, en cada orificio.
5. Mezclar con cuidadoso balanceo, dejar a 28 ° C. Leer a los 30 min.

Interpretación

La última dilución en la que la hemoaglutinación es completa, se toma como punto final de actividad hemoaglutinante (HA), considerándose a la misma como que contienen una Unidad Hemoaglutinante (UHA). La recíproca de esta dilución expresa el número de Unidades Hemoaglutinantes o título del virus en UHA.

Inhibición de la hemoaglutinación

1. Se pone una gota de 0,025 ml de PBS en cada orificio de la policubeta, excepto en el primer orificio de la primera columna.
2. Se colocan 0,025 ml de suero tratado y diluido 1/5 en cada orificio de la primera columna, utilizando una pipeta para cada suero. Se agrega una gota de 0,025 ml al segundo y último orificio.
3. Proceder a diluir dobles seriadas con las pipetas de 0,025 ml, desde el segundo hasta el penúltimo orificio.
4. Agregar la suspensión de virus con pipeta de 0,025 ml. una gota de 0,025 ml por orificio, excepto en el último orificio (control de inhibidores hemoaglutinantes no específicos, presentes en el suero problema).
5. Dejar una hora a temperatura ambiente (unión virus -anticuerpo).
6. Agregar una gota de 0,05 ml. de la suspensión de glóbulos rojos 1% a cada orificio, incluyendo los controles de suero.
7. Mezclar suavemente. Dejar a 28 °C durante 30 min.
8. Lectura: no debe observarse hemoaglutinación en los controles de suero. La titulación de virus debe corresponder a 8 UHA/ 0,025 ml.

Interpretación

Se tomará como punto final de la actividad del suero, la máxima dilución en la que el fenómeno de hemoaglutinación ha sido inhibido. El resultado final se expresa en Unidades Inhibidoras de la Hemoaglutinación (UIHA). La recíproca de la dilución de punto final de la actividad del suero, multiplicada por las unidades hemoaglutinantes del virus utilizado (8 UHA) nos dará el número de dosis inhibitorias hemoaglutinantes del suero por unidad de volumen.

5.8 NECROPSIA

5.8.1 MATERIAL

- Cuchillos
- Pinzas Kelly
- Pinzas Kocher
- Tijeras de Mayo
- Bolsas Ziploc
- Solución de formalina amortiguada al 10%
- Bascula analítica gramo-gramo (marca Omrom wbs-05 con una capacidad del 0 a 5000 gr)
- Incinerador para material orgánico que no fue relevante para el experimento.¹⁵⁸

5.8.2 METODO

La realización de la necropsia se hizo con la finalidad de extraer órganos de los diferentes tratamientos para su posterior fijación con solución de formalina al 10%.¹⁶⁵

Se realizó la necropsia para cada caso conforme al Manual de Necropsias de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Cardenti et al. 2008), una vez que se realizó la extracción de órganos sistemática y ordenadamente se procedió a hacer pesaje de los siguientes órganos de forma independiente para cada ave, todo esto para valorar y tener un índice morfométrico para poder así ponderar tamaño de ave y su relación con el tamaño de los órganos.

Se llevó un control en un tabulador donde se especificó el peso del ave, así como de cada órgano: hígado, riñón, bazo, bolsa cloacal, estomago muscular (molleja), intestino; posterior a ello se tomó una solución amortiguada de formalina al 10% y se infundió una muestra representativa de manera aleatoria si no se observó ningún cambio morfológico macroscópico de los tejidos, la porción de tejido colectado se fijó en solución de formalina al 10%, para su posterior procedimiento histológico, esto último con la finalidad de encontrar lesiones sugestivas por toxicidad por aflatoxinas y la interacción con las PCL.¹⁶⁵

5.9 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

Es esencial una revisión sistemática de cada órgano para asegurar que todos los componentes sean examinados. La técnica para el examen de un corte histológico variará dependiendo de si se elige evaluar la laminilla durante, o después de la revisión, pero los siguientes principios generales son recomendables:¹⁶⁶

- 1.- Tener previsto un patrón histológico a evaluar
- 2.- El evaluador de todas las muestras deberá ser el mismo
- 3.- Solo evaluar lo previsto en el patrón histológico

5.9.1 MATERIAL

- kilos de parafina grado histológico
- 5 cajas de porta objetos
- 3 cajas de cubreobjetos
- 1 galón de xilol
- 1 galón de alcohol absoluto
- 1 Histoquinete
- Platina
- 1 Micrótomo
- 1 Kit de tinción Hematoxilina y eosina.

5.9.2 METODO

Las muestras fueron procesadas y una vez ya inmersos en formol, se colocaron en celdas para inclusión en parafina para su posterior montura en cubos de parafina, el proceso de corte fue a 5 μm , su posterior proceso de pigmentación con la técnica de Hematoxilina y Eosina citada por Montalvo 2010.¹⁶⁷

La elaboración de laminillas se hizo con la finalidad de correlacionar los hallazgos morfo patológicos encontrados entre las interacción entre los tratamientos PCL y AFB.

5.10 HIPERSENSIBILIDAD CUTÁNEA

Las pruebas de hipersensibilidad cutánea retardada ofrecen una gran información en la evaluación inicial de la inmunidad mediada por células. Ello se debe a que, en la mayor parte de los casos, existe una buena correspondencia entre la reactividad a la prueba cutánea y las pruebas in vitro para el estudio de la inmunidad celular. A efectos prácticos, el hallazgo de una respuesta normal en la prueba de hipersensibilidad cutánea retardada hace menos probable la existencia de una inmunodeficiencia celular significativa.¹⁶⁸

La prueba de hipersensibilidad cutánea retardada se basa en la administración intradérmica de 0,1 ml de un antígeno soluble. La respuesta al antígeno se considera positiva cuando se obtiene una induración superior o igual a 2 ml a las 48-72 horas de su inoculación. Habitualmente se utiliza una batería de antígenos frente a la cual se encuentra sensibilizado, al menos, el 80% de la población que se va a examinar. Los antígenos comúnmente empleados son: derivado proteico purificado (PPD) o tuberculina, Candida, Trichophyton, estreptoquinasa-estreptodomasia, toxoide tetánico o diftérico y otros.

5.10.1 MATERIAL

- Phitoheamaglutinina (PHA-A Sigma-Aldrich, Inc) a una concentración de 0.1 mg/0.1 ml (las diluciones correspondientes se realizaron con Solución PBS).¹⁶⁰
- 1 caja de jeringas volumen 1.0 ml, 250 ml de alcohol 96%
- Algodón
- Vernier digital
- Vernier estándar milimétrico (Trupper mod-CALDI-6MP, cap. mínima .001 y 0.1 m)
- 1 litro de solución salina estéril Pisa(Sodio 38.5 mEq 77 mEq 154 mEq, Cloruro 38.5 mEq 77 mEq 154 mEq).¹⁶⁰

5.10.2 METODO

De forma general se realizó la limpieza de los pliegues interdigitales con torundas de alcohol para no introducir patógenos al tejido subcutáneo y alterar la respuesta del tejido; la inoculación intradérmica en la membrana interdigital fue de las falanges 3 y 4 de la extremidad inferior derecha con fitoheamaglutinina, en la membrana interdigital de la extremidad inferior izquierda se realizó el mismo procedimiento utilizando solución salina estéril (0.1 ml) como testigo ya que no contiene pirógenos u agentes contaminantes. A las 24 h. pos-inoculación, se determinó el grosor de la membrana interdigital de ambas extremidades con un vernier digital.¹⁶⁹

Al tener presente la fitoheamaglutinina en el tejido se formó una reacción Ag/Ac en la zona de aplicación y el objetivo fue medir la interacción entre los diferentes tratamientos con PCL y AFB; se medirá la reacción que forme el tejido por la aplicación de la fitoheamaglutinina y la solución salina.¹⁶⁵

5.11 BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Un apartado importante de la analítica sanguínea es la determinación de numerosos parámetros bioquímicos, es decir la concentración de diversas sustancias químicas transportadas por la sangre en un momento dado.

5.11.1 MATERIAL

- Espectrofotómetro Varuan Modelo Cary 100
- Platina de calor
- Gradillas
- Tubos de ensaye volumen 5 ml
- Matraz aforado 10 ml
- Matraz aforado 50 ml
- Matraz aforado 100 ml
- Pipetas 1 mm
- Pipetas 5 mm
- Pipetas 10 mm
- Bullas para pipetas
- Cronometro
- Multipipetas INTECH 0.2 -50 ul
- Micropipeta 50-100 ul

5.11.2 METODO

5.11.2.1 RESPUESTA ENZIMÁTICA

Las transaminasas son enzimas que cumplen una función metabólica en el interior de las células. Estas enzimas se encuentran presentes en el tejido de muchos órganos (hígado, corazón, riñones, músculos, etc). El nivel de concentración de las transaminasas en la sangre refleja la actividad del hígado y del corazón.

- *ALANINA-AMINOTRANSFERASA (ALT) - TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA (TGP)*

Las células hepáticas producen la enzima ALT o TGP. Las concentraciones de ALT o TGP aumentan cuando las células hepáticas están dañadas o se están muriendo. A concentraciones de ALT más elevadas, mayor muerte celular o inflamación del hígado está ocurriendo. Sin embargo, las ALT no siempre son buenos indicadores de qué tan bien está funcionando el hígado, sólo una biopsia del hígado puede revelar eso.

Las concentraciones de ALT pueden permanecer bajas aún si el hígado está inflamado o se está formando tejido cicatricial, o durante la fase inmuno tolerante.

PROCEDIMIENTO	
A) 30 ó 37°C	
I- MACROTECNICA	
En una cubeta mantenida a 30-37°C, colocar:	
Reactivo A reconstituido	2 ml
Muestra	200 ul
Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Luego de 1 minuto registrar la absorbancia inicial (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO) y luego, a los 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Determinar la diferencia promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.	
II- MICROTECNICA	
En una cubeta mantenida a 30-37°C, colocar:	
Reactivo A reconstituido	1 ml
Muestra	100 ul
Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Continuar de modo similar al descrito en el procedimiento (A-I).	
B) 25°C	
MACROTECNICA	
Emplear 500 ul de Muestra. Luego de agregar la muestra mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Luego de 3 minutos registrar la absorbancia inicial (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO). Continuar de modo similar al descrito en el procedimiento A-I.	

- *ASPARTATO-AMINOTRANSFERASA (AST) -TRANSAMINASA GLUTÁMICO OXALOACÉTICA (TGO)*

Tal como la enzima ALT, la AST es una enzima producida por las células hepáticas, pero los músculos también producen AST y puede estar elevada por enfermedades diferentes a

la enfermedad hepática. Por ejemplo, a menudo la AST es alta durante un infarto del miocardio (ataque al corazón).

Las concentraciones de AST pueden ser normales, y de todas maneras se puede estar presentando daño hepático. Esta prueba agrega tan sólo otro punto de vista más sobre la enfermedad hepática.

PROCEDIMIENTO	
A) 30 ó 37°C	
I- MACROTECNICA	
En una cubeta mantenida a 30-37°C, colocar:	
Reactivo A reconstituido	2 ml
Muestra	200 ul
Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Luego de 1 minuto registrar la absorbancia inicial (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO) y luego a los 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Determinar la diferencia promedio de absorbancia/min ($\Delta A/min$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.	
II- MICROTECNICA	
En una cubeta mantenida a 30-37°C, colocar:	
Reactivo A reconstituido	1 ml
Muestra	100 ul
Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Continuar de modo similar al descrito en el procedimiento (A-I).	
B) 25°C	
MACROTECNICA	
Emplear 500 ul de Muestra. Luego de agregar la muestra mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Luego de 3 minutos registrar la absorbancia inicial (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO). Continuar de modo similar al descrito en el procedimiento A-I.	

- **FOSFATASA ALCALINA (FAS)**

La fosfatasa alcalina es una enzima producida en las vías biliares, intestinos, riñones, placenta y huesos. Esta enzima se mide para ayudar a los médicos a determinar si una enfermedad está concentrada en las vías biliares o en el hígado. Cuando la concentración de esta enzima está alta y las concentraciones de ALT y AST bastante normales, puede haber un problema en las vías biliares, como una obstrucción. Algunos trastornos óseos también pueden ser causa de un alza en la concentración de la fosfatasa alcalina.

Metodología

PROCEDIMIENTO			
En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocar:			
	B	S	D
Reactivo A reconstituido	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Preincubar en baño de agua a 37°C unos minutos. Luego agregar:			
Suero	-	-	50 ul
Standard	-	50 ul	-
Mezclar, incubar exactamente 10 minutos (cronómetro) y agregar:			
Reactivo C	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Mezclar de inmediato cada tubo. Retirar los tubos del baño y leer en espectrofotómetro a 520 nm o en fotocolorímetro con filtro verde, llevando el aparato a cero de absorbancia con agua destilada.			

- **DESHIDORGENASALACTICA (LDH).**

La LDH se encuentra ampliamente distribuida en el citoplasma celular de casi todos los tejidos, aunque es especialmente relevante su presencia en las células hepáticas. Las concentraciones de LDH en los tejidos son unas 500 veces superiores a las existentes en suero, por lo que incluso lesiones celulares pequeñas pueden provocar la liberación de la enzima y aumentar su concentración plasmática de forma significativa. Uno de los principales efectos de los fármacos es provocar lesiones hepáticas y aumentar artificialmente la concentración en suero de un componente típicamente citoplasmático, como es el caso de la LDH.

La Lactato Deshidrogenasa se encuentra presente en todas las células del organismo aunque sus mayores concentraciones se hallan en el hígado, corazón, riñón, músculo esquelético y eritrocitos. Los niveles séricos elevados de LDH se observan en muchas circunstancias. Los valores altos (elevaciones de 2 a 40 veces el valor normal) se ven en caso de anemia megaloblástica, en carcinomatosis extensas, en el shock grave y en la anoxia. Subidas moderadas (de 2 a 4 veces) ocurren en enfermos con infarto de miocardio, infarto pulmonar, leucemia granulocítica o aguda, anemia hemolítica, mononucleosis infecciosa, y distrofia muscular progresiva. Se producen ligeras elevaciones relativas en casos de hepatitis, ictericia obstructiva o cirrosis. Los pacientes con una nefropatía crónica, sobre todo con síndrome nefrótico o con anemia hemolítica tienen también cifras altas. Los valores de LDH también aumentan en el mixedema, presumiblemente a causa de las alteraciones musculares.

PROCEDIMIENTO

A) 25°C

En una cubeta mantenida a la temperatura de trabajo, colocar:

Reactivo A reconstituido	3 ml
---------------------------------	------

Preincubar unos minutos, luego agregar:

Muestra	100 ul
----------------	--------

Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Esperar 30 segundos. Leer la absorbancia inicial (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO) y luego a los 1, 2 y 3 minutos de la primer lectura. Determinar la diferencia promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.

B) 30-37°C

Emplear 50 ul de Muestra, siguiendo el procedimiento antes indicado.

5.11.2.2 CONCENTRACIÓN SÉRICA DE TRANSAMINASAS

Una vez obtenido el suero se procedió a descongelar y hacer las pruebas correspondientes para la cuantificación de Transaminasas.

Las técnicas de forma explícita del como se realizaron lo muestran los manuales de origen Wiener Lab. :

- Transaminasa Glutámico Oxaloacética (TGO)(AST)¹⁷⁰
- Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP)(ALT)¹⁷¹
- Lactato deshidrogenasa (LDH) ¹⁷²
- Fosfatasaalcalina (FAS)¹⁷³

5.12 ANÁLISIS DEL PIGMENTO

El alimento de finalización contenía Xantofilas grado alimenticio (apocaroteno) 35 ppm liofilizado en el alimento de finalización y éste se comenzó a dar después de la 4 semana para medir al día 48 la pigmentación sobre la piel.

5.12.1 MATERIAL

- Colorímetro de reflectancia Minolta CR400.¹⁷⁴

5.12.2 METODO

Para la realización de la lectura de la pigmentación amarilla de la piel, se usó como referencia la piel en zona que se le denomina apterilo lateral (vena de la grasa). Se colocó el fotocolorímetro sobre la superficie cutánea y se procedió a lectura.

Las características de la lectura se basan en los siguientes datos: por medio de colorimetría la cual es la técnica que cuantifica el color y obtención de valores numéricos de color, estos son vistos por el ojo humano, específicamente, el rojo, el verde y el azul (también referidos en inglés como Red, Green, Blue "RGB"). Esta medición de color "triestímulo" proporciona datos sobre la cantidad de los tres componentes que están presentes en la luz reflejada (sólidos) o transmitida (típicamente los líquidos) por un producto alimenticio, el espectro de luz a leer es el denominado "B" (azul y amarillo) dado en unidades delta, los datos obtenidos del programa del aparato de reflectancia fueron los de la columna B* y posteriormente se tabularon los datos obtenidos.^{169,175}

6.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Las variables productivas, hematológicas, bioquímicas sanguínea e inmunológicas se analizaron conforme a un diseño completamente al azar, realizando la comparación de medias a través de la prueba **LDS** (Least Significant Difference) $p < 0.05$.
- Las variables no paramétricas como son lesiones macroscópicas y lesiones microscópicas, se analizaron por medio de un diseño completamente al azar y comparación de medias por medio de **Kruskal-Wallis**. Los datos se analizaron utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion 16[®] Plus con un nivel de significancia de $p < 0.05$.¹⁷⁶
- El Método de la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher, sustenta que el riesgo global, puede ser considerablemente aumentado usando este método. Específicamente en la medida que aumenta, el error tipo I, del experimento entre el número de experimentos en el cual un error de tipo I es hecho y el número total de experimentos se torna grande. El procedimiento LSD es sencillo de utilizar; se puede aplicar tanto en modelos equilibrados como no-equilibrados. Además proporciona también intervalos de confianza para diferencias de medias.

7.0 DISEÑO EXPERIMENTAL

- 360 pollitos sin sexar, distribuidos en 12 tratamientos con 3 repeticiones y 10 pollitos por repetición (Cuadro 6).
- El periodo experimental fue de 49 días para asemejar un ciclo productivo comercial.

Cuadro 6 - Distribución de tratamientos

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS Y/O PCL
I	AFB 100 µg/Kg + PCL 0.5 Kg/Ton (AFB100+PCL1)
II	AFB 100 µg/Kg + PCL 1.0 Kg/Ton (AFB100+PCL2)
III	AFB 200 µg/Kg + PCL 0.5 Kg/Ton (AFB200+PCL1)
IV	AFB 200 µg/Kg + PCL 1.0 Kg/Ton (AFB200+PCL2)
V	AFB 300 µg/Kg + PCL Kg/Ton (AFB300+PCL1)
VI	AFB 300 µg/Kg + PCL 1.0 Kg/Ton (1 ppm) (AFB300+PCL2)
VII	AFB 100 µg/Kg AFB 100
VIII	AFB 200 µg/Kg AFB 200
IX	AFB 300 µg/Kg AFB 300
X	PCL 0.5 Kg/Ton (PCL1)
XI	PCL2 1.0 Kg/Ton (PCL2)
XII	AFB 0.0 µg/g + PCL 0.0 Kg/Ton

8.0 RESULTADOS

Al alimento balanceado se le determinó la concentración de aflatoxinas totales y no fueron detectadas con la metodología, VICAM.¹⁷⁷

Tabla 01 – Peso Acumulado Final (g) - mostrando medias y Error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Media ± EE (g)</i>
PCL 2	2971.44 ± 172.15 d
PCL 1	2716.82 ± 129.48 bcd
Control	2790.90 ± 36.84 cd
AFB 300 PCL2	2379.34 ± 133.10 a
AFB 300 PCL1	2452.88 ± 89.17 ab
AFB 300	2366.43 ± 87.56 a
AFB 200 PCL2	2803.74 ± 137.67 cd
AFB 200 PCL1	2813.89 ± 48.43 cd
AFB 200	2459.75 ± 86.77 ab
AFB 100 PCL2	2740.98 ± 27.06 bcd
AFB 100 PCL1	2850.07 ± 74.41 cd
AFB 100	2623.88 ± 103.43 abc

AFB=aflatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

Peso Acumulado final

En la Tabla 01 se observan las siguientes diferencias:

- 1- Los tratamientos que obtuvieron en su dieta AFB obtuvieron medias sin diferencia estadística ($p < 0.05$) en relación a sus similares que contenían PCL.
- 2- Los tratamientos donde existe AFB sin PCL, obtienen las medias (peso) más bajas del experimento ($p < 0.05$).
- 3- Se encontró una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en los tratamientos que en su formulación no llevaron AFB (Control, PCL1 y PCL2), la media (peso) es mayor que todos los tratamientos con AFB; dentro de estos 3 tratamientos la PCL2 (1.0 Kg/Ton) tiene el mayor peso promedio de todo el experimento.
- 4- Los tratamientos con AFB 300 (µg/kg) y sus mezclas con PCL1 y PCL2 obtuvieron los pesos más bajos de todo el experimento ($p < 0.05$), lo que significa que las paredes celulares también tienen límites en donde ya no

existe acción benéfica aun con contenidos muy elevados en el alimento; esto se demostró con aflatoxinas, pero se desconoce su efecto con otras toxinas.

- 5- El uso de paredes celulares mejora los parámetros productivos (peso vivo final), mostrando un efecto positivo sobre los tratamientos que en su dieta contenían AFB; sin embargo, a dosis o cantidades aproximadas a 300 µg/Kg de AFB, dicho efecto no se observa ($p > 0.05$).
- 6- Un efecto relevante de utilizar PCL es el hecho de que a mayor contenido de la misma, ejemplo la PCL2 (1.0 Kg/Ton), el peso final estuvo por arriba de los tratamientos de PCL (0.05 Kg/Ton) y Control; al expresar estadísticamente los valores y haciendo análisis con los tratamientos AFB el grupo con más peso durante el experimento fue el grupo PCL1 (0.05 Kg/Ton) cuando la AFB está presente.

Discusión:

Mariam y Eshak (2010)¹⁷⁸ comentaron que el uso de las levaduras de *Saccaromyces cerevisiae* ayudan a reducir los efectos indeseables de las aflatoxinas, algo similar sucedió con el uso de las paredes celulares de levadura, el efecto positivo observado se vio observado en el peso corporal y en la conversión alimenticia (Arce, 2005)¹⁷⁹; este mismo efecto se presentó en el experimento, donde las aves con tratamientos que incluían pared celular obtuvieron un peso corporal con medias más altas.

Un dato nuevo arrojado durante el experimento, muestra que una concentración de 0.5 Kg/Ton es más eficiente que 1.0 Kg/Ton, principalmente en los tratamientos donde la PCL esta mezclada con AFB 100 y 200 (µg/Kg).

Por otra parte, la utilización de PCL como aditivo en el pollo de engorda durante un periodo de 49 días aumentó los parámetros productivos (peso vivo final); esto constató los efectos positivos del uso de paredes celulares adicionado al alimento balanceado de las aves de engorda, debido a que son promotores biológicos de las vellosidades intestinales aumentando la superficie de contacto con el alimento y favoreciendo una mejor digestibilidad de los mismos.¹⁷⁸

En 2007 Márquez comento sobre la eficacia de PCL extraídas de diferentes cepas de *Saccaromyces cerevisiae*, la importancia sobre la integridad intestinal y el desempeño productivo en aves de engorda; datos que son equiparables en este experimento.

En este experimento se encontró que el uso de PCL de *Saccaromyces cerevisiae* en pollos que consumieron alimento contaminado con AFB 300 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$), resultó ser ineficaz ya que los pesos promedios fueron bajos en todos los tratamientos; datos reportados por Keller en el 2012¹⁸⁰ indican que la PCL a 2 ppm en combinación con AFB 1 ppm no modifica los valores negativos en peso vivo, conversión alimenticia y consumo de alimento.

Algunas variables que puede explicar esta diferencia entre los experimentos, son el uso de diferentes líneas productivas (Cobb en el experimento de Keller y Ross 308 en este experimento) y la detección de diferentes aflatoxinas (Keller no constata en su experimento el hecho que AFB sea la única micotoxina present; en este experimento se determinaron varias micotoxinas y se sabe que era aflatoxina b la única presente).

Tabla 02 - Consumo de alimento (CA) expresado en gramos e índice de conversión alimenticia (IC) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Consumo de Alimento Media ± EE g</i>	<i>Índice de Conversión Alimenticia Media ± EE (IC)</i>
PCL 2	4816.67 ± 72.65 a	1.63 ± 0.10 a
PCL 1	4600.00 ± 200.00 a	1.70 ± 0.10 ab
Control	5400.00 ± 28.87 b	1.97 ± 0.04 bc
AFB 300 PCL2	5516.67 ± 72.65 b	2.33 ± 0.14 de
AFB 300 PCL1	4933.33 ± 359.74 a	2.00 ± 0.17 c
AFB 300	5643.33 ± 168.95 bc	2.40 ± 0.10 e
AFB 200 PCL2	6126.67 ± 26.67 d	2.20 ± 0.10 cde
AFB 200 PCL1	6184.00 ± 20.23 d	2.17 ± 0.04 cde
AFB 200	5490.00 ± 5.77 b	2.23 ± 0.08 cde
AFB 100 PCL2	5643.33 ± 80.90 bc	2.07 ± 0.03 cd
AFB 100 PCL1	5979.33 ± 17.19 cd	2.10 ± 0.06 cd
AFB 100	5525.00 ± 108.97 b	2.10 ± 0.06 cd

AFB=afatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

Consumo de alimento

En la Tabla 02 se muestra que la presencia de AFB afectó los parámetros productivos (consumo de alimento y conversión alimenticia $p < 0.05$); se observó que en los tratamientos que en la mezcla solo llevaban AFB mostraron menos consumo que los tratamientos que contenían PCL mezclada, así como el grupo control ($p < 0.05$).

Se demostró que en los tratamientos que solo se les agregó AFB (AFB 100, AFB 200 y AFB 300 µg/Kg) el peso promedio estuvo por debajo de su subgrupo (AFB + PCL1) ($p < 0.05$).

Los tratamientos donde se agregó PCL1 (0.5 Kg/Ton) mostraron un peso promedio superior a los tratamientos adicionados solamente con AFB (AFB 100, AFB 200 y AFB 300 µg/Kg).

Los tratamientos que en sus mezclas solo llevaban PCL demostraron consumos por debajo de 4700 g por ave lo que indica, junto con el peso final, que tuvieron menor consumo además de índice de conversión bajo ($p > 0.05$).

Cabe resaltar que dentro los tratamientos que mostraron un menor consumo de alimento fueron los que contenían PCL1 (0.5 Kg/Ton) observándose que no solo obtuvieron mejores pesos, sino que obtuvieron índices de conversión más bajos.

En el grupo Control se obtuvieron pesos muy similares a los tratamiento con AFB y su mezcla con PCL, observándose el consumo de alimento sin diferencia estadística ($p>0.05$); es importante resaltar que los tratamientos donde solo se adicionó PCL mostraron menor consumo con diferencia estadística ($p>0.05$) entre los tratamiento con AFB y con PCL.

Por último, los tratamientos que más consumieron alimento fueron los AFB 200 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) y dentro de estos, los AFB 200 + PCL1 y AFB 200 + PCL2 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) obtuvieron promedio altos de consumo, aunque se encontró diferencia estadística ($p>0.05$) comparando el peso de las aves entre los estos tratamientos.

Discusión

Kelly en 2012, después de analizar los resultados obtenidos en su experimento expuso el hecho de que el consumo alimenticio en dietas suplementadas con AFB y PCL no presentaban diferencia significativa entre estos ni entre los tratamientos control.

En el presente experimento se pudo observar la misma tendencia, principalmente en los tratamientos con AFB 100, AFB 100 + PCL1 ,AFB 100 + PCL2 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).

El tratamiento de AFB 200 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) mostró menor consumo como reflejo de la cantidad de AFB adicionada, obteniéndose medias más altas ($p<0.05$) en el peso de órganos como hígado y riñón, pero con deterioro orgánico microscópico (tumefacción celular en hepatocitos y células tubulares renales).

Índice de conversión alimenticia

Los tratamientos con AFB 100, AFB 100 + PCL1 Y AFB 100 + PCL2 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) no mostraron diferencia estadística en la conversión alimenticia ($p>0.05$); la relación del peso con la conversión alimenticia en estos tratamientos mostró una diferencia entre ellos; la adición de PCL tuvo un efecto positivo en los tratamientos con AFB 100, 200 y 300 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$), obteniendo medias de consumo más bajas , teniendo aún mejor conversión.

Los tratamientos de AFB 200, AFB 200 + PCL1 y AFB 200 + PCL2 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) mostraron conversiones alimenticias más altas, siendo el principal el tratamiento de AFB 200 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$). También se observaron medias más altas en el consumo de alimento y evidentemente en el peso final con diferencia estadística ($p<0.05$); haciendo un comparativo con los tratamientos que incluyen PCL en su mezcla se observó que al aumentar los contenidos de AFB cambio los resultados de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia.

Los tratamientos con AFB 300, AFB 300 + PCL1 y AFB 300 + PCL2 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) se destacaron por presentar los pesos más bajos, las media de consumo más bajas y las conversiones altas del experimento.

El hecho de aumentar la cantidad de AFB en el alimento (300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) generó un efecto negativo en las aves, observándose aves pequeñas y de bajo peso.

En los tratamientos PCL1 (0.5 Kg/Ton) y PCL2 (1.0 Kg/Ton) se presentaron conversiones más bajas comparadas con el tratamiento control.

Discusión

Es notable el hecho de que la PCL adicionada a AFB, tenga un efecto positivo, ya que mantiene pesos similares a los tratamientos PCL1, PCL2 y Control.

Un efecto similar describe Márquez en 2007, donde los tratamientos que contenían paredes celulares ofrecían un mejor índice de conversión que los que solamente contenían AFB.

Solís¹⁸¹ en 2009, señaló que, de los promotores nutricionales que influyen en la función del intestino, las PCL de *Saccharomyces cerevisiae* son las que más favorecen a las vellosidades intestinales, ejerciendo un efecto positivo en su tamaño y favoreciendo la superficie de absorción de nutrientes.

Tabla 03 - Concentración de proteínas plasmáticas totales (g/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Media ± EE g/l</i>	
PCL 2	21.67 ± 1.99	bc
PCL 1	29.73 ± 1.99	f
Control	25.62 ± 2.15	cdef
AFB300 PCL2	23.95 ± 1.99	bcdef
AFB300 PCL1	13.82 ± 2.15	a
AFB300	18.05 ± 2.35	ab
AFB200 PCL2	26.44 ± 2.15	cdef
AFB200 PCL1	24.65 ± 1.99	cdef
AFB200	21.64 ± 2.15	bcd
AFB100 PCL2	30.53 ± 2.35	f
AFB100 PCL1	28.53 ± 2.15	ef
AFB100	27.93 ± 2.35	def

AFB=afatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

Proteínas totales

En la Tabla 03 se observó que las proteínas totales en los tratamientos AFB 300, AFB 300 + PCL1 y AFB 200 (µg/Kg), son menores ($p < 0.05$) comprándolas al resto de los tratamientos.

Los tratamientos que en su mezcla contenían PCL mostraron altos promedios de proteínas comprándolos con los tratamientos que contenían AFB; siendo los tratamientos con PCL2 (1.0 Kg/Ton) los que obtuvieron los mejores promedios, se puede decir que mayor contenido de PCL mayor es la cantidad de proteína detectada.

Discusión

Los principales contribuyentes a la presión osmótica del plasma sanguíneo son los iones y en una pequeña proporción las proteínas. Sin embargo, la baja constante de presión osmótica de las proteínas es vital para el mantenimiento del sistema cardiovascular. Se distinguen dos grandes grupos de proteínas del plasma: las albúminas y las globulinas. Se separan unas de otras por medios químicos sencillos y determinando la cantidad de cada grupo se obtiene la relación A-G. El incremento en las proteínas totales puede deberse a la

deshidratación la cual presenta una hemoconcentración por vómito o diarrea, también por un aumento en el nivel de globulina cuando no existe deshidratación, como en enfermedades hepáticas avanzadas (cirrosis), infecciones crónicas, enfermedades tóxicas y en algunos casos de neoplasias. Una disminución en los niveles de las proteínas totales se debe siempre a un nivel bajo de la albúmina, acompañado ya sin incremento del nivel de globulina, o por un incremento en el nivel de globulina que es menor que el descenso en el nivel de albúmina. Por lo tanto la relación A-G disminuye. Esto puede ocurrir por: Pérdida de albúmina en orina por nefrosis, pérdidas de proteínas plasmáticas por hemorragias, falta de ingestión de cantidades adecuadas de proteínas en la dieta, incapacidad del hígado para producir albúmina por hepatitis, cirrosis hepática o hepatopatías.¹⁸²

En el presente trabajo se muestran efectos en donde a mayores contenidos de AFB, las proteínas totales sus medias disminuyen, y se ve efecto positivo cuando a las dietas se les adiciona PCL.

Tabla 04 - Concentración de albumina en proteínas plasmáticas (g/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Media + EE g/l</i>	
PCL 2	24.15 ±1.99	abcd
PCL 1	40.67 ±1.99	e
Control	26.72 ±2.15	bcd
AFB300 PCL2	29.76 ±1.99	d
AFB300 PCL1	23.06 ±2.15	abcd
AFB300	22.14 ±2.35	abc
AFB200 PCL2	29.55 ±2.15	cd
AFB200 PCL1	25.60 ±1.99	abcd
AFB200	18.28 ± 2.15	a
AFB100 PCL2	19.36 ±2.35	ab
AFB100 PCL1	20.35 ± 2.15	ab
AFB100	22.41 ±2.35	abcd

AFB=afatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

Albumina

En la Tabla 04 se muestra que el tratamiento PCL1 (0.5 Kg/Ton) obtuvo el promedio más alto de albumina mostrando diferencia estadística ($p < 0.05$) sobre todos los demás tratamientos.

Se encontró que los tratamientos AFB 100, AFB 100 + PCL1, AFB 100 + PCL2 y AFB 200 (µg/Kg) no mostraron diferencia estadística ($p > 0.05$); sin embargo, fueron los promedios más bajos de albumina de todo el experimento.

Discusión

No se encontraron artículos en donde se comente acerca de la cantidad de proteínas totales y albumina con las mismas características experimento (AFB 100, AFB 200, AFB 300 µg/Kg + PCL 0.5 y 1.0 µg/Ton).

El hígado es el órgano responsable de proveer las proteínas plasmáticas que ayudan a regular la presión osmótica; un método para conocer el desempeño de este órgano es la medición de la concentración de proteínas totales y la albumina, (Sandoval 1999).¹⁸³

Las hipoproteinemias se pueden observar en numerosos procesos patológicos, por lo general se deben a disminuciones en la concentración de albúmina o de tipos proteicos

(albúmina y globulinas). Son raros los casos en los que se producen disminuciones de globulinas con albúmina normal.

Las hipoalbuminemias más habituales en la práctica se producen por pérdida de albumina por vía urinaria, pérdida intestinal o por disminución en su síntesis. La pérdida de albumina que exceda la capacidad hepática de síntesis puede causar una hipoalbuminemia tan marcada que cause sinología (formación de edema por el descenso de la presión oncótica vascular).

Es por ello que en los tratamientos donde la alimentación fue suplementada con AFB (desde 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) mostraron disminución en la concentración de proteínas totales y albumina debido a la toxicidad de las aflatoxinas causando daño hepático (Arana, 2012)¹⁸⁴. Es evidente que el hecho de haber utilizado paredes celulares (Gómez, 2009)¹⁶⁹ funcionó como adsorbente de aflatoxinas, aumentando el desempeño productivo. El uso de PCL a una concentración de 1.0 Kg/Ton mejoró los niveles de proteínas totales y albumina, cuando AFB se encontraba presente en el alimento aunque no en todos los casos se encontró diferencia estadística la mayoría de los casos coinciden sobre el efecto benéfico de las PCL.

Tabla 05 – Pigmentación de la piel (*b) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Media ± EE *b</i>	
PCL 2	15.43 ± 0.91	cd
PCL 1	14.67 ± 1.93	bcd
Control	17.34 ± 2.38	d
AFB300 PCL2	14.76 ± 1.36	bcd
AFB300 PCL1	11.55 ± 1.33	abc
AFB300	7.25 ± 1.43	a
AFB200 PCL2	14.45 ± 1.21	bcd
AFB200 PCL1	10.40 ± 0.93	ab
AFB200	7.51 ± 1.59	a
AFB100 PCL2	14.32 ± 1.81	bcd
AFB100 PCL1	14.78 ± 1.52	bcd
AFB100	13.61 ± 2.13	bcd

AFB=aflatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

Pigmentos

En la Tabla 05 se observa que los tratamientos suplementados con PCL (0.05-1.0 Kg/Ton) tuvieron mayor absorción del pigmento, observándose en la pigmentación de la piel (b*), cuando AFB (100, 200 y 300 µg/Kg) sin PCL se encontró presente en el alimento estos presentaron baja pigmentación. Aunque sin diferencia significativa para AFB 100 y mezclas PCI ($p > 0.05$).

Los tratamientos con AFB 300 (µg/Kg) sin PCL, no mostraron buena pigmentación, esto se observó principalmente a la mala absorción del pigmento en tracto intestinal, recordemos que las AFB provocan trastornos digestivos por daño en la mucosa.

Discusión

Mallmann et al. (2007)¹⁸⁵ mencionan que las aflatoxinas presentes en los alimentos hacen que la implantación de la pigmentación sea deficiente debido a la menor absorción, reducción en el transporte y deposición residual de los carotenoides de la dieta.

La aflatoxicosis conocida como “síndrome del ave pálida”, es apreciable principalmente en los tratamientos donde la aflatoxina no se encontró en combinación con PCL y se puede decir que a mayor contenido de AFB en el alimento marca una gran diferencia entre tratamientos AFB, observándose aves con poca pigmentación incluso a simple vista y marcando una diferencia entre AFB 100,200 y 300 (µg/Kg).

Tabla 06 - Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) en micro placa (Unidades hemoaglutinantes UHA - g/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Media ± EE UHA gr/l</i>	
PCL2	1075.20 ± 399.88	bc
PCL1	1216.00 ± 483.19	c
CONTROL	1216.00 ± 483.19	c
AFB300 PCL2	409.60 ± 62.71	abc
AFB300 PCL1	608.00 ± 241.59	abc
AFB300	85.33 ± 21.33	a
AFB200 PCL2	320.00 ± 64.00	ab
AFB200 PCL1	416.00 ± 204.90	abc
AFB200	320.00 ± 110.85	ab
AFB100 PCL2	614.40 ± 102.40	abc
AFB100 PCL1	896.00 ± 424.53	abc
AFB100	768.00 ± 430.91	abc

AFB=afatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

Inhibición de la hemoaglutinación (HI)

En la Tabla 06 se observa que los tratamientos adicionados con AFB tuvieron una diferencia mínima significativa ($p > 0.05$), sin embargo en los tratamientos Control, PCL1 y PCL2 se observó una respuesta positiva al HI y alcanzaron títulos más altos para virus de Newcastle ($p < 0.05$).

Al comparar los tratamientos con AFB y los adicionados con PCL no se encontró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) pero si se observó que los tratamientos que solo incluían AFB obtuvieron los títulos de HI más bajos.

Las AFB por tener afinidad por órganos como el hígado, bolsa cloacal y bazo afectan la producción de proteínas plasmáticas e inmunoglobulinas.

Discusión

La OIE (World Organization Animal Health) en su Manual Terrestre (2012)¹⁸⁶ menciona a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) como la mayormente utilizada en la serología diagnóstica de la Enfermedad de Newcastle; su precisión depende del estado inmunitario vacunal de las aves a analizar y de las condiciones predominantes de la enfermedad. Las aflatoxinas, como comenta Saume et al. (2006)¹⁸⁷,

causan inmunodepresión del ave y suelen ser responsables del incremento de la susceptibilidad a diversas enfermedades infectocontagiosas al verse afectados los sistemas de inmunidad celular y humoral; Saume concluye que la ingesta de 200 ppb (200 µg/Kg) de AFB1 causaron supresión del sistema inmune, lo que trajo como consecuencia aves mucho más susceptibles a agentes infecciosos oportunistas, respondiendo deficientemente a los programas de vacunación.

Yiannikouris (2008)¹⁸⁸ comentó que los tratamientos en donde aparece AFB tienen títulos más bajos; en este experimento se observó que en los tratamientos donde solo esta AFB 100, AFB 200 y AFB 300 (µg/Kg) los títulos también se obtuvieron bajos y en los tratamientos donde se adicionó PCL se encontró una mejor respuesta aunque no mostraron diferencia significativa ($p>0.05$).

Se observó que PCL fungió como adsorbente de AFB. Gómez et al. (2008)¹⁶⁹, comentaron que las dietas comerciales para ave de engorda mejoran los parámetros productivos cuando se adiciona PCL ya que absorbe e inhibe la adsorción de AFB y con esto existe una mejor respuesta vacunal; este mismo efecto se puede observar en tratamientos en donde la PCL se encontro sola, sin diferencia estadística ente PCL1, PCL2 y Control.

Tabla 07 - Fosfatasa Alcalina (FAS u/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Media ± EE u/l</i>	
PCL 2	0.47 ± 0.20	abcd
PCL 1	0.35 ± 0.03	abc
Control	0.28 ± 0.17	ab
AFB300 PCL2	0.33 ± 0.10	abcd
AFB300 PCL1	0.53 ± 0.22	bcd
AFB300	0.89 ± 0.09	d
AFB200 PCL2	0.58 ± 0.13	bcd
AFB200 PCL1	0.48 ± 0.10	bcd
AFB200	0.80 ± 0.04	cd
AFB100 PCL2	0.02 ± 0.24	a
AFB100 PCL1	0.23 ± 0.22	ab
AFB100	0.56 ± 0.16	bcd

AFB=aflatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

Fosfatasa alcalina FAS (u/l)

En la Tabla 07 se observa que los tratamientos con AFB, incrementaron la cantidad de enzima FAS (u/l). En los tratamientos donde solo se encontraba AFB 100, AFB 200, y AFB 300 (µg/Kg) se acentuó la lesión hepática, mostrando más cantidad de enzima FAS ($p < 0.05$).

Se encontró diferencia estadística entre los tratamientos AFB 100, AFB 100 + PCL1 y AFB 100 + PCL2 (µg/Kg) ($p < 0.05$), este patrón se repitió también entre los tratamientos AFB 200 y AFB 300 (µg/Kg) mostrando las medias más altas en los tratamientos que sólo contenían AFB.

Los tratamientos PCL1, PCL2 y Control no mostraron diferencias significativas y tuvieron comportamientos similares.

Discusión

Existen pocos autores que comentan la cinética enzimática de las aves de engorda, aunque Ezquerria-Brauer (2012)¹⁸⁹ comentó que la presencia de aflatoxinas en el alimento concentrado para camarón mostró un aumento en la enzima FAS; en dicho experimento

se demostró que la presencia de AFB aumenta la enzima circulante en sangre, ya que es indicativa de daño al tejido tisular (hepático-hepatopancreas)

En el presente experimento se demostró que la enzima FAS se incrementa en sangre cuando existe lesión celular siendo el órgano mas importante para este efecto el hígado. Este efecto se detectó cuando se alimentaron aves con AFB resultando medias más altas para los tratamientos en donde solo se adicionó AFB.

El investigador Solis et al. (2007)¹⁸¹ mencionan que el consumo de AFB en aves productoras de huevo (AFB 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) y PCL (2 Kg/Ton) adicionado al alimento comercial no fue suficiente para revertir los efectos negativos de las AFB.

En el presente experimento se demostró que las PCL tienen límites para ejercer su efecto positivo en presencia de AFB, que en este caso fue dosis efectiva para AFB 200 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) y PCL 0.5 (Kg/Ton), ya que no solo se observaron cambios en las variables productivas sino también en la sinética enzimática para FAS, siendo en este caso, niveles con medias más bajas de FAS (para los tratamientos mezclados con PCL). De igual forma con lo comentado por Ezquerro-Brauer (2012)¹⁸⁸ en este experimento se demostró que la PCL a 1 y a 0.5 (Kg/Ton), no tiene efectividad contra AFB 300 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).

Tabla 08 - Alanin Amino Transferasa/ Transaminasa Glutámico Pirúvica (ALT/GPT - u/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Media ± EE u/l</i>	
PCL 2	0.02 ± 0.00	ab
PCL 1	0.03 ± 0.01	abc
Control	0.01 ± 0.00	a
AFB300 PCL2	0.03 ± 0.01	ab
AFB300 PCL1	0.03 ± 0.01	abc
AFB300	0.07 ± 0.01	d
AFB200 PCL2	0.01 ± 0.00	a
AFB200 PCL1	0.03 ± 0.01	abc
AFB200	0.04 ± 0.01	bc
AFB100 PCL2	0.02 ± 0.01	ab
AFB100 PCL1	0.03 ± 0.01	abc
AFB100	0.05 ± 0.00	cd

AFB=afatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

Alanin Amino Transferasa/ Transaminasa Glutámico Pirúvica ALT/GPT (u/l).

La Tabla 08 muestra los incrementos en la enzima ALT obtenidos en los tratamientos con AFB 100, AFB 200 y AFB 300 (µg/Kg) con diferencia estadística entre ellos ($p < 0.05$).

Los tratamientos de AFB que contenían PCL mostraron promedios bajos en la concentración de enzima ALT ($p < 0.05$); por otro lado, los tratamientos adicionados con PCL1 Y PCL2 o los que solamente contenían PCL no mostraron diferencia estadística ($p > 0.05$).

Esto demostró un efecto positivo, debido a que los tratamientos de PCL con AFB 100, AFB 200 o AFB 300 (µg/Kg) tuvieron menos lesiones hepáticas y aumentó la efectividad de la PCL como adsorbente. Sin duda el tratamiento que presentó más daño hepático fue el tratamiento AFB300 ($p < 0.05$); debido a la alta concentración de ALT circulante en sangre.

Discusión

La ALT es una enzima localizada principalmente en el hígado y en menor medida en corazón, riñones y musculo cuando hay una lesión en alguno de estos órganos los niveles de ALT aumentan. Tomando en cuenta que las aflatoxinas provocan daño a los hepatocitos y a otros órganos, junto con el análisis de FAS, se hizo notar que la enzima circulante ALT fue resultado de la lesión hepática provocada por AFB (Sánchez 2009).¹⁹⁰

La PCL ayudó a disminuir los efectos causados por AFB (por sus características de adsorbente de micotoxinas).

Las enzimas demuestran el estatus hepático y que en la mayoría de los casos el diagnóstico es llevado por medio de la lesión hepática; desde el punto de vista patológico que las lesiones francas de toxicidad asociada a AFB se presentan en un periodo de 21 días como mínimo y son observables en órganos como son hígado y órganos linfoides.

Perez-Arevalo et al. (2012)¹⁹¹ observaron lesiones histológicas importantes (necrosis hepática) dadas por aflatoxinas en pollitos de 1 día de vida así como en ave de postura, utilizaron concentraciones de 4000 µg/Kg, este experimento dio a notar que para llevar a cabo un diagnostico histológico debe haber niveles de toxicidad aguda y por lo tanto lesiones microscópicas francas.

Tabla 09 - Aspartato Amino Transferasa/ Transaminasa Glutámico Oxalo Acética de (AST /GOT - u/l)- mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Media ± EE u/l</i>	
PCL 2	0.61 ± 0.06	a
PCL 1	0.78 ± 0.13	ab
Control	0.60 ± 0.03	a
AFB300 PCL2	0.75 ± 0.14	ab
AFB300 PCL1	0.57 ± 0.05	ab
AFB300	1.35 ± 0.13	b
AFB200 PCL2	1.14 ± 0.20	cd
AFB200 PCL1	1.09 ± 0.21	ab
AFB200	0.74 ± 0.04	ab
AFB100 PCL2	0.74 ± 0.13	a
AFB100 PCL1	0.85 ± 0.17	ab
AFB100	0.57 ± 0.04	ab

AFB=afatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

Aspartato Amino Transferasa/ Transaminasa Glutámico Oxalo Acética de AST /GOT (u/l).

En la Tabla 09 se observa que la enzima AST mostró medias altas, éstas principalmente se presentaron en los tratamientos AFB 100, AFB 200 Y ABF 300 (µg/Kg) que no contenían PCL ($p < 0.05$).

Los tratamientos AFB 200 Y AFB 300 (µg/Kg) mostraron medias más altas con diferencia estadística ($p > 0.05$) en relación a sus tratamientos AFB 200 y AFB 300 (µg/Kg) con PCL1 y PCL2.

El tratamiento AFB 300 + PCL1 (0.5 Kg/Ton) mostró medias más bajas que en los de tratamientos AFB 300 y AFB 300 + PCL2 (µg/Kg), dando un efecto positivo y este es representado por la dado por la baja concentración de enzima AST circulante.

Los tratamientos con AFB y PCL no mostraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) en relación a los tratamientos libres de AFB (PCL1, PCL2 y Control); este dato es importante ya que se puede decir que existe un efecto positivo y protector hepático cuando se suplementa con PCL en el alimento.

Discusión.

La AST es una enzima aminotransferasa que se encuentra en varios tejidos, especialmente en el corazón, hígado y tejido muscular, cuando alguno de estos órganos tiene daño se observan cantidades elevadas de esta enzima en el suero (infarto agudo de miocardio, hepatopatía aguda, miopatías, por el empleo de determinados fármacos y en cualquier enfermedad o trastorno en el cual resulten seriamente dañadas las células).

Arrieta et al. (2006)¹⁹², realizó un experimento en donde se utilizó AFB (70 µg/Kg), mostrando morfología histológica hepática, renal y esplénica alterada, así como alteraciones en las enzimas AST y ALT; los investigadores hicieron observaciones en donde debido a las contenidos de AFB en el experimento no se obtuvieron lesiones evidentes de la toxicidad (reflejadas bajo microscopia) pero si son contundentes en análisis de laboratorio para valoración enzimática (AST y ALT) además hay que considera que las aves fueron Hubbar x Hubbar, los cuales se han encontrado genéticamente mas resistentes a las AFB pero con parámetros productivos más bajos que la estirpe Ross 308.

Con este mismo enfoque se cuantificaron las enzimas en este experimento, haciendo ver que los tratamientos con AFB 300 (µg/Kg) mostraron aumento en AST y ALT así como lesiones macroscópicas por daño crónico.

Tabla 10 - Deshidrogenasa láctica (LDH - u/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Media ± EE U/l</i>	
PCL 2	6.38 ± 0.50	d
PCL 1	5.68 ± 0.23	cd
Control	3.96 ± 0.80	abc
AFB300 PCL2	4.05 ± 0.93	abc
AFB300 PCL1	3.26 ± 0.87	ab
AFB300	5.44 ± 0.75	cd
AFB200 PCL2	3.07 ± 0.89	ab
AFB200 PCL1	3.88 ± 0.81	abc
AFB200	4.96 ± 1.50	bcd
AFB100 PCL2	2.74 ± 0.85	ab
AFB100 PCL1	2.42 ± 0.16	a
AFB100	3.17 ± 0.75	ab

AFB=afatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

Deshidrogenasa Láctica LDH (u/l).

En la Tabla 10 se observan medias altas de la enzima LDH para los tratamientos AFB 200 y AFB 300 (µg/Kg), en relación con los sub tratamientos que contenían PCL (p<0.05).

Un efecto que aparece como hallazgo es el hecho de encontrar ambos tratamientos de PCL sin AFB (PCL1 y PCL2) con medias altas (p<0.05).

Discusión

La LDH es una enzima que aunque, no es específica de riñón, se produce en la célula cuando existen procesos en donde se ve asediada la viabilidad de las células tubulares.

La LDH tiene un gran variedad de isoenzimas con leves diferencias en su estructura, que sugieren diferentes orígenes por cada tejido (LDH1 del corazón, LDH2 del sistema retículo endotelial, la LDH3 de los pulmones, la LDH4 de los riñones, la LDH5 del hígado y músculo) los altos niveles de LDH indican un pronóstico de supervivencia menos favorable para células.

Los niveles de LDH también se usan para vigilar la presencia de células cancerosas, ya que esta enzima se activa en presencia de aductos; las AFB forma aductos (afatoxicol)¹⁹³ por lo que también se utilizó para detectarla.

El hecho de encontrar medias altas solo en los tratamientos PCL1 y PCL2 puede tener relación con lo comentado por Colombie y Sablayrolles en 2004¹⁹³, en donde, después de hacer análisis de *Saccharomyces c.* en vino, se encontró que en el proceso de fermentación de ciertos factores (parte de su genoma y sus componentes de membrana celular) fungen como prebióticos para otras levaduras como lo es *Lactobacillum plantarum* haciendo que a su vez éstas fermenten y produzcan LDH. Tuvieron como hipótesis que las otras levaduras quizá se absorbían vía digestiva y por consiguiente la LDH encontrada era de origen externo.¹⁹⁴

Tabla 11 - Peso del Bazo (%) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Promedio ± EE %</i>	
PCL 2	0.19 ± 0.04	cd
PCL 1	0.17 ± 0.03	bcd
Control	0.15 ± 0.04	bcd
AFB300 PCL2	0.15 ± 0.08	bcd
AFB300 PCL1	0.16 ± 0.03	bcd
AFB300	0.07 ± 0.02	a
AFB200 PCL2	0.19 ± 0.07	bc
AFB200 PCL1	0.20 ± 0.05	c
AFB200	0.13 ± 0.03	bc
AFB100 PCL2	0.18 ± 0.06	bcd
AFB100 PCL1	0.19 ± 0.06	bcd
AFB100	0.13 ± 0.05	b

AFB=afatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa α

Peso del bazo (%).

La Tabla 11 muestra que los tratamientos de PCL sin mezcla con AFB presentaron medias de peso sin diferencia estadística ($p>0.05$) comparándolos con los tratamientos que contenían AFB.

El tratamiento AFB 300 (µg/Kg) presentó medias más bajas que los de su mismo bloque (AFB con PCL) ($p<0.05$).

Tabla 12 – Peso de Bolsa Cloacal (%). - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Media ± EE %</i>	
PCL 2	0.19 ± 0.02	cd
PCL 1	0.17 ± 0.01	bcd
Control	0.15 ± 0.01	bcd
AFB300 PCL2	0.15 ± 0.03	bcd
AFB300 PCL1	0.16 ± 0.01	bcd
AFB300	0.07 ± 0.01	a
AFB200 PCL2	0.20 ± 0.03	cd
AFB200 PCL1	0.20 ± 0.02	d
AFB200	0.13 ± 0.01	bc
AFB100 PCL2	0.18 ± 0.03	bcd
AFB100 PCL1	0.19 ± 0.02	bcd
AFB100	0.13 ± 0.02	b

AFB=afatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$.

Bolsa cloacal (%).

La Tabla 12 muestra que al estar AFB presente en alimento y ser absorbida en el tracto digestivo llegando a órganos blanco, interactúa con el tejido, dañando órganos y provocando secuelas, como es el bajo peso relativo(%) en bolsa cloacal.

En los tratamientos con AFB (AFB 100, AFB 200 Y AFB 300 µg/kg) se observaron medias bajas en todos los casos en comparación con sus mismos tratamiento adicionados con PCL ($p < 0.05$).

El tratamiento AFB 300 presentó las medias porcentuales más bajas de todo el experimento, lo que indico el deterioro de la bolsa cloacal en presencia de AFB. No obstante el hecho de usar PCL para contrarrestar los efectos de AFB hizo que en los tratamientos PCL1 y PCL2 mostraran un efecto positivo, además de que entre las dos diferentes concentraciones de PCL, la que se mostró mejores medias fue PCL1.

Se observaron en los tratamientos AFB 100 y AFB 200 (µg/kg) sin PCL bolsas cloacales más pequeñas, los cortes histológicos mostraron depleción y menor protección inmunológica ($p < 0.05$).

Los tratamientos PCL1, PCL2 Y Control no mostraron diferencias estadísticas sobre los tratamientos con AFB + PCL. Esto último sustenta que el uso de PCL por su forma de adsorber las AFB, disminuye sus efectos en órganos blancos como lo es la bolsa cloacal.

Tabla 13 - Peso de Hígado (%). - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

Tratamiento	Promedio \pm EE %	
PCL 2	2.72 \pm 0.22	abc
PCL 1	2.61 \pm 0.32	ab
Control	2.75 \pm 0.45	abc
AFB300 PCL2	3.41 \pm 0.50	cd
AFB300 PCL1	3.11 \pm 0.58	bcd
AFB300	3.72 \pm 1.21	c
AFB200 PCL2	2.56 \pm 0.34	ab
AFB200 PCL1	2.55 \pm 0.57	ab
AFB200	3.05 \pm 0.93	abcd
AFB100 PCL2	2.43 \pm 0.31	ab
AFB100 PCL1	2.50 \pm 0.23	ab
AFB100	2.35 \pm 1.12	a

AFB=afatoxina, 100=100 μ g/Kg, 200=200 μ g/Kg, 300 =300 μ g/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, \pm =error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa α <0.05.

Peso de hígado (%).

En la Tabla 13 se aprecian que los tratamientos AFB 200 y AFB 300 (μ g/Kg), a comparación con los otros tratamientos, mostraron órganos más grandes y por lo tanto de mayor peso ($p < 0.05$). Los tratamientos AFB 300 + PCL1 y AFB 300 + PCL2 no mostraron diferencia significativa entre ellos, aunque mostraron un peso porcentual más alto que los demás tratamientos ($p > 0.05$).

Los tratamientos PCL1, PCL2 y Control no mostraron diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre ellos. Los tratamientos que llevaron como aditivo PCL1 obtuvieron mejores porcentajes de peso promedio.

Fue evidente la absorción de AFB (dado el tamaño de hígado) por lo que el hecho de agregar PCL hizo que el daño sobre tejidos fuera menor. La PCL, por su actividad adsorbente, impidió el paso de la toxina al torrente circulatorio y así evitó daño en los órganos blanco.

Las aflatoxinas, como ya es sabido, tienen órganos blancos (riñón, hígado, bazo, bolsa cloacal, etc.) y una característica que presentan es el aumento de peso dado a sus procesos degenerativos, en donde se acumulan una mayor cantidad de agua haciendo que en general el órgano adquiera mayor peso.

Tabla 14 - Peso de Riñón (%). - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Promedio ± EE %</i>	
PCL 2	0.19 ±0.04	cd
PCL 1	0.17 ±0.03	cde
Control	0.15 ±0.04	cde
AFB300 PCL2	0.15 ±0.08	cde
AFB300 PCL1	0.16 ±0.03	cde
AFB300	0.07±0.02	a
AFB200 PCL2	0.19±0.07	cd
AFB200 PCL1	0.20 ±0.05	d
AFB200	0.13±0.03	bc
AFB100 PCL2	0.18 ±0.06	bcd
AFB100 PCL1	0.19±0.06	bcd
AFB100	0.13±0.05	b

AFB=afatoxina, 100=100 µg/Kg, 200=200 µg/Kg, 300 =300 µg/Kg, PCL1= 0.05 Kg/Ton, PCL2=1.0 Kg/Ton, ±=error estándar
 Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa α

Peso de Riñón %.

La Tabla 14 arrojó evidencia de que el uso de PCL redujo los efectos producidos por las AFB; los tratamientos donde no se adicionó PCL, mostraron medias más altas (peso en comparación con los tratamientos fueron adicionados con PCL ($p<0.05$)).

El tratamiento que presentó medias más altas en el porcentaje de peso de riñón fue AFB 300 (µg/kg). Los tratamientos AFB 100 y AFB 200 (µg/kg) y sus sub tratamientos adicionados con PCL1 y PCL2 no mostraron diferencias significativas ($p>0.05$).

Los efectos de la AFB sobre riñón son lesiones varias, donde una de ellas es el aumento del tamaño por tumefacción celular y por lo tanto, más peso; este mismo efecto sucedió en los tratamientos adicionados con AFB en cualquiera de sus concentraciones (AFB 100, AFB 200 Y AFB 300 µg/Kg).

Discusión general para peso relativo de órganos (%).

En 2009 SAGARPA^{5,6} emitió un comunicado para el sector agropecuario en donde se comentan las repercusiones que tienen las aflatoxinas en las aves de engorda; en éste se mencionan los órganos blanco como son hígado, bolsa cloacal, bazo y riñón. Mallmann¹⁸⁴ en un reporte emitido en 2009 en la Universidad Nacional de Colombia, menciona que las aflatoxinas en pollo de engorda causan efectos tóxicos y detrimentales en los órganos blanco provocando degeneración y necrosis tisular; lesiones que se relacionan directamente con contenidos y dosificación en estos a animales.¹⁹⁵

En este experimento, se llevó a cabo evaluación esplénica de dos tipos, la primera por peso y la segunda microscópicamente.

En los tratamientos sin la adición de PCL se encontró que fueron los tejidos en donde se denotó mayor lesión esplénica con un número celular mononuclear bajo por campo; este es el motivo por el cual al peso de bazo (ponderado) nos muestra medias bajas y con diferencia estadística ($p < 0.05$).

En un experimento realizado en 2002 por Marquez-Gonzalez, demostraron que con el uso de PCL en alimento contaminado con AFB1 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$), la PCL funge como adsorbente de AFB1 (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), teniendo una adsorción del 97.8%; lo que indica que la PCL evita el paso de la toxina a circulación sanguínea y por lo tanto, disminución de lesiones en órganos blanco.¹⁹⁶

En las aves, los linfocitos B se diferencian o maduran en la bolsa cloacal. Este órgano es una sección modificada de la pared dorsal de la cloaca; se trata de un órgano linfoepitelial que presenta una estructura redonda en forma de saco.

Las aflatoxinas afectan la bolsa cloacal produciendo daño a la matriz linfoide y por ende, una menor producción de linfocitos al tracto vascular.

En el presente experimento, como resultado de la administración de AFB sin PCL, se demostraron medias bajas que se traduce en bolsas cloacales más pequeñas.

Pérez-Arévalo et al. (2012) realizaron experimentos en donde demostraron los efectos en órganos blanco (bolsa cloacal). Eran aves reproductoras a las que se les administró AFB 20 mg/kg y AFB 4 mg/kg, aunque el contenido fue 10 veces lo dosificado en este experimento, Pérez-Arévalo encontraron que las lesiones en bolsa cloacal se observaron tanto en las aves reproductoras como en los embriones demostrando que existe difusión transovárica de la toxina.¹⁹⁷

En general, los datos observados sugieren que existe adsorción de AFB en presencia de PCL por lo tanto menos lesión en órganos blanco.

Para las variables que a continuación se mencionaran no se encontraron diferencia estadística significativa $p>0.05$.

- Mortalidad
- Intradermorreacción
- Peso porcentual de ventrículo
- Peso porcentual de proventrículo
- Histopatológico

9.0 CONCLUSIONES

El uso de paredes celulares (PCL) como aditivo en el alimento del pollo de engorda mejora los parámetros productivos como son ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia, siendo eficiente contenidos de 1.0 Kg/Ton.

Las contenidos de PCL a 0.5 Kg/Ton fueron muy efectivas en los tratamientos de AFB 100 y AFB 200 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$), obteniendo mejores parámetros productivos (ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia).

La utilización de PCL a contenidos de 0.5 y 1.0 Kg/Ton como aditivo en el alimento del pollo de engorda no redujo los efectos tóxicos provocados por las AFB en contenidos de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en cuanto a los parámetros productivos se refiere (ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia); sin embargo en alimento contaminado con AFB (100, 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) para pollo de engorda, si se obtuvo una respuesta positiva en cuanto a la variable de proteínas totales, lo que indica que el hígado da una respuesta positiva por ese aditivo.

Los contenidos de AFB 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en alimento del pollo de engorda disminuyeron significativamente las proteínas plasmáticas inclusive cuando el alimento contenía PCL a contenidos de 0.5 y 1.0 Kg/Ton.

La pigmentación de la piel de las aves se vio disminuida cuando el alimento contenía de 100-300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AFB, no obstante el uso de PCL promovió una mayor absorción del pigmento cuando este se encontraba en contenidos de 0.5 y 1.0 Kg/Ton.

Los contenidos de AFB (100, 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) en alimento para pollo de engorda fueron un factor perjudicial para la respuesta vacunal contra la enfermedad de Newcastle, debido a que se mostraron títulos bajos para la respuesta inmune para la prueba en microplaca de HI; no obstante, la adición de PCL en el alimento a contenidos de 0.5 y 1.0 Kg/Ton promovió una mejor respuesta. El tratamiento de PCL de 0.5 Kg/Ton fue que mostro mejores promedios.

La utilización de PCL en concentraciones de 0.5 y 1.0 Kg/Ton en el alimento del pollo de engorda redujo significativamente los efectos tóxicos de la AFB en contenidos de 100, 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, observable en la variable enzimática FAS.

La transaminasa ALT/GPT se vió afectada cuando existía AFB en el alimento a contenidos de 100, 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, no obstante, se redujeron los efectos tóxicos con la utilización de PCL en contenidos de 0.5 y 1.0 Kg/Ton; el contenido de PCL a 0.5 Kg/Ton obtuvo mejores promedios y por ende más adsorción de AFB.

En los tratamientos contaminados con AFB 100, AFB 200 y AFB 300 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$), la transaminasa AST/GOT mostró medias altas; el uso de PCL mezclado con dicho alimento en contenidos de 0.5 y 1.0 Kg/Ton disminuyó los efectos lesivos en hígado, dado sus características adsorbentes para AFB.

La utilización de PCL en contenidos de 0.5 y 1.0 Kg/Ton en el alimento del pollo de engorda redujo significativamente los efectos tóxicos de la AFB 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; este resultado se valoró en las medias relacionadas con la transaminasa LDH. Los tratamientos de PCL que resultaron con mejores medidas fueron 0.5 Kg/Ton.

La utilización de PCL de 0.5 y 1.0 Kg/Ton en el alimento del pollo de engorda redujo significativamente los efectos tóxicos de la AFB en concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ este efecto se observó en el peso ponderado de órganos como son bazo y bolsa cloacal. El efecto positivo de PCL en estos órganos se puede apreciar ya que no obtuvieron diferencia significativa ($p < 0.05$), comparando a los tratamiento que no tenían AFB.

En las variables de peso ponderado hepático y renal se obtuvieron pesos medios y sin diferencia estadística, esto debido a la utilización de PCL a de 0.5 y 1.0 Kg/Ton en el alimento del pollo de engorda, reduciendo significativamente los efectos tóxicos de la AFB 100 y AFB 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

La utilización de PCL a de 0.5 y 1.0 Kg/Ton en el alimento del pollo de engorda no fue capaz de eliminar los efectos negativos cuando existen en el alimento AFB 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y las concentraciones de PCL son de 0.5 Kg/Ton. Esto fue observable en: variables productivas, Hi, transaminasas hepáticas y peso ponderado de órganos blanco (hígado, riñón, bazo y bolsa cloacal).

En general; la utilización de PCL en Contenidos de 0.5 y 1.0 Kg/Ton en el alimento del pollo de engorda redujo significativamente los efectos tóxicos para las variables productivas (consumo de alimento, ganancia peso, conversión alimenticia, peso porcentual de hígado, riñón, bazo y bolsa cloacal; así como transaminasas ALT/GPT, FAS, AST/GOT, LDH y prueba de microplaca HI) cuando el alimento estaba contaminado con AFB en concentraciones de 100 o 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. De ambos contenidos de PCL, la de mejores resultados en general fue PCL 0.5 Kg/Ton. Por otra parte se observó que los tratamientos con AFB 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ no fueron beneficiados con ninguna contenido de PCL (0.5 y 1.0 Kg/Ton).

10.0 ANEXO GRÁFICOS

Grafico 01 - Peso Acumulado Final – peso (g) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL

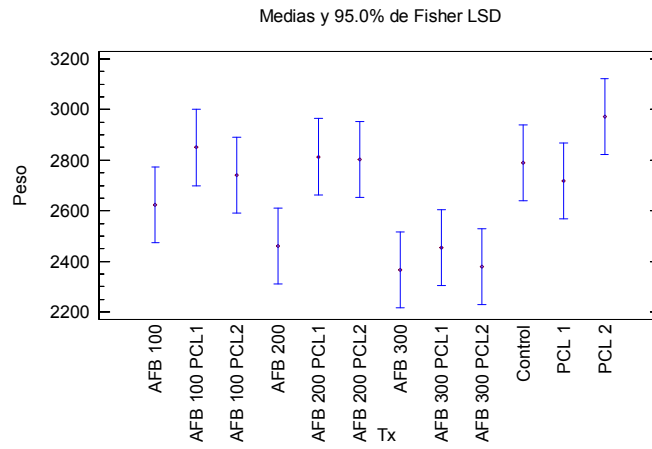


Grafico 02 - Consumo de alimento (xbar cons – g) expresado en gramos e índice de conversión alimenticia (CV1) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

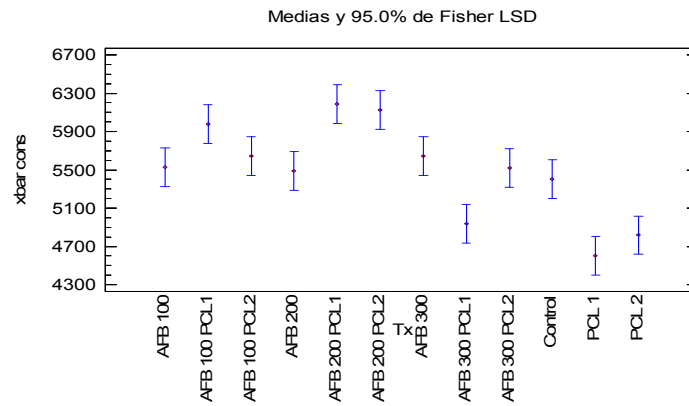
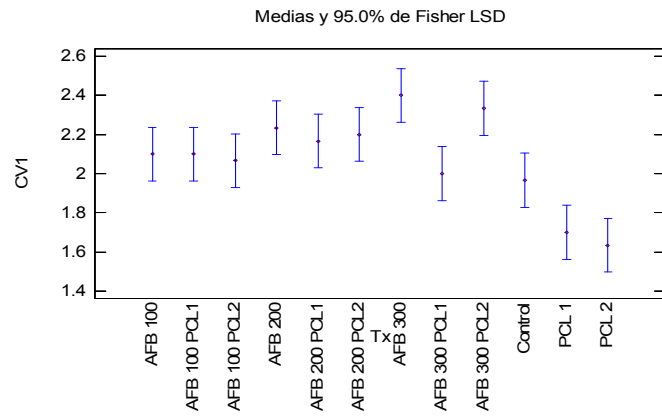


Grafico 03 - Concentración de proteínas plasmáticas totales - PT (g/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

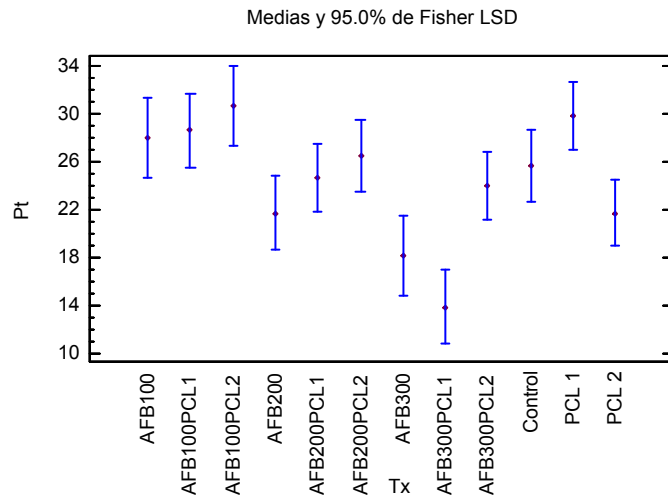


Grafico 04 - Concentración de albumina en proteínas plasmáticas (g/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

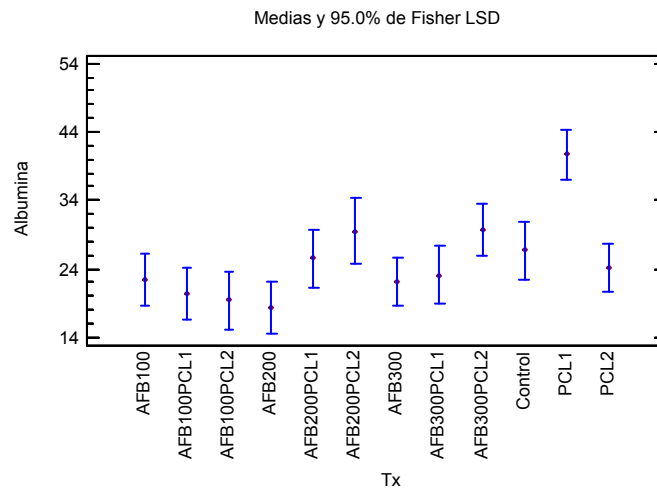


Grafico 05 - Pigmentación de la piel (b) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

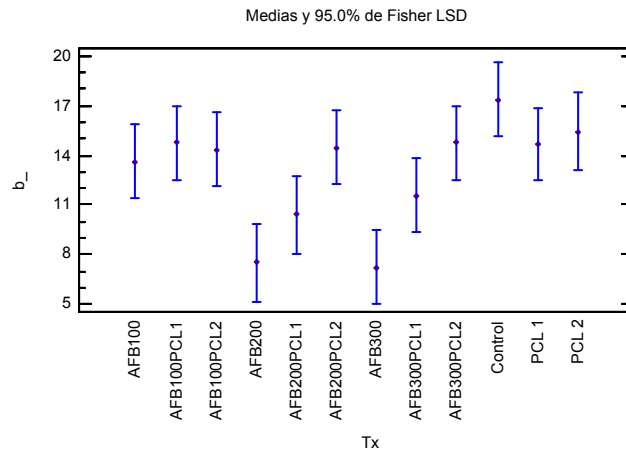


Grafico 06 - Inhibición de la Hemoaglutinación (Arreglo 1-8) en micro placa (Unidades hemoaglutinantes UHA - g/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

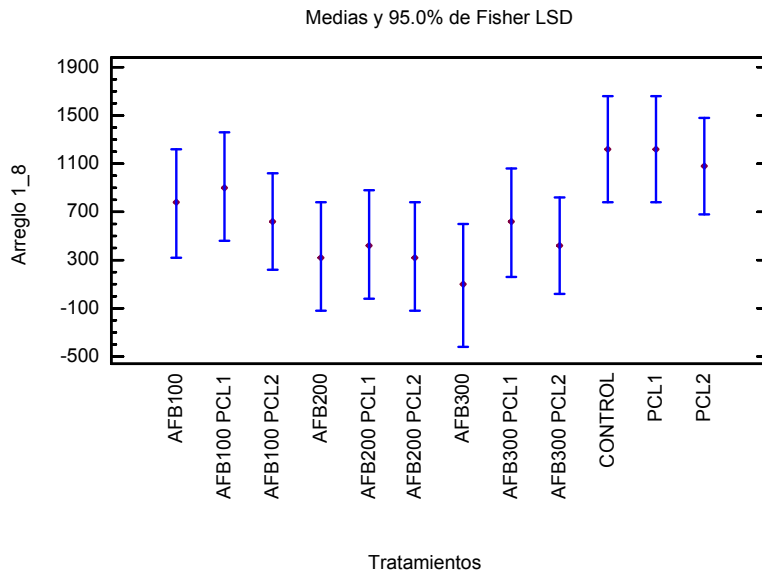


Grafico 07 - Fosfatasa Alcalina (FAS u/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

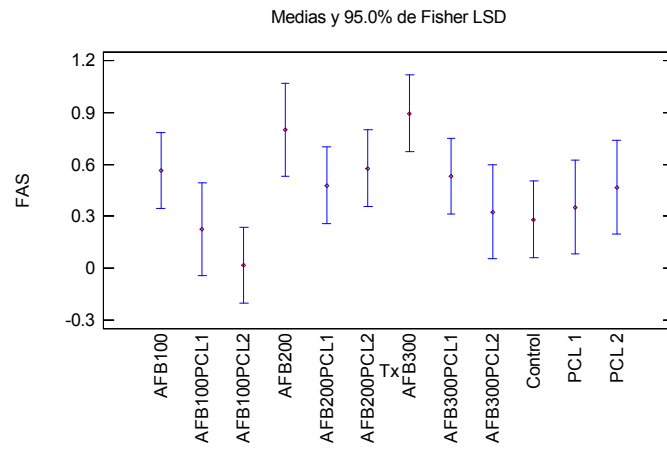


Grafico 08 - Alanin Amino Transferasa/ Transaminasa Glutámico Pirúvica (ALT/GPT - u/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

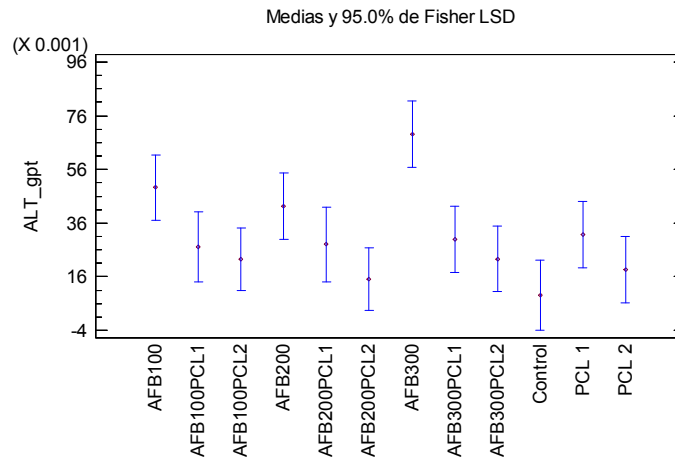


Grafico 09 - Aspartato Amino Transferasa/ Transaminasa Glutámico Oxalo Acética de (AST /GOT - u/l)- mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

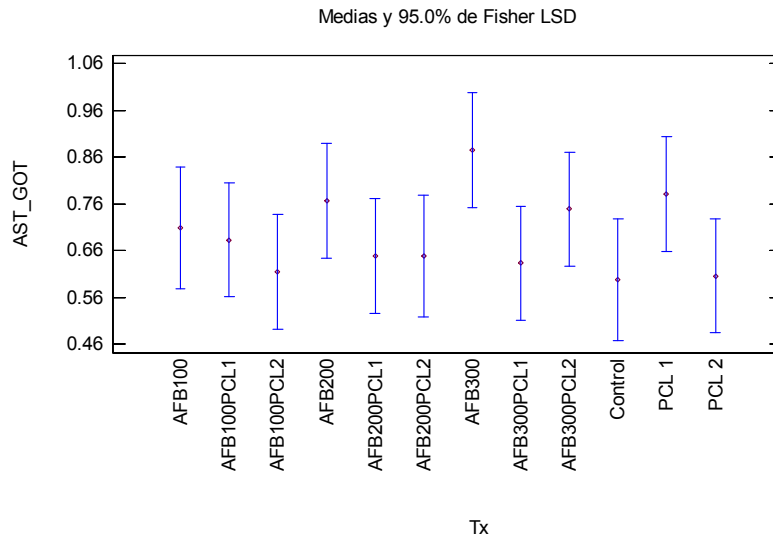


Grafico 10 - Deshidrogenasa láctica (LDH - u/l) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

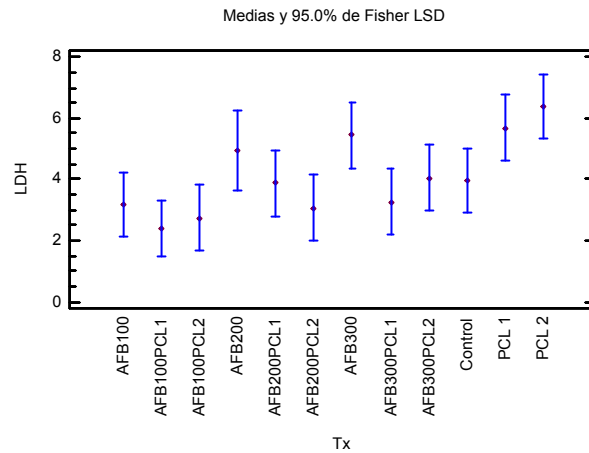


Grafico 11 - Peso del Bazo (%) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

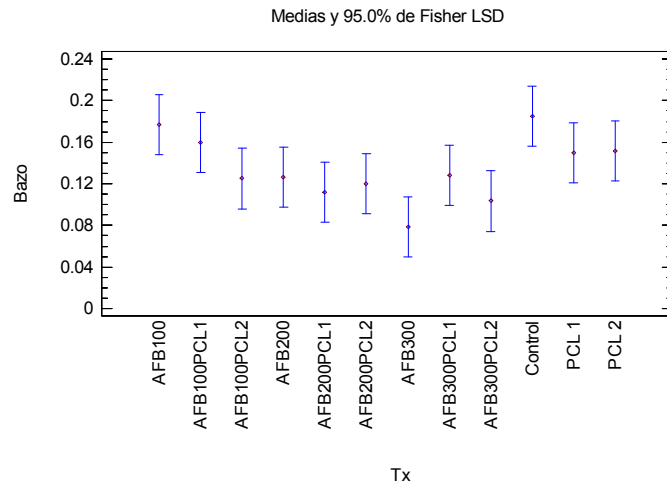


Grafico 12 - Peso de Bolsa Cloacal (%) - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

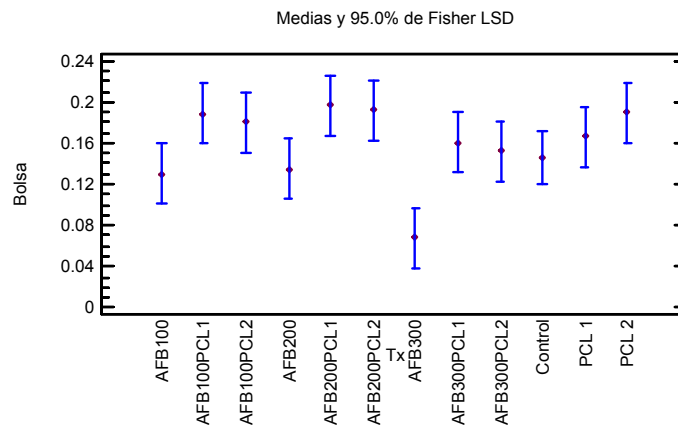


Grafico 13 - Peso de Hígado (%). - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.

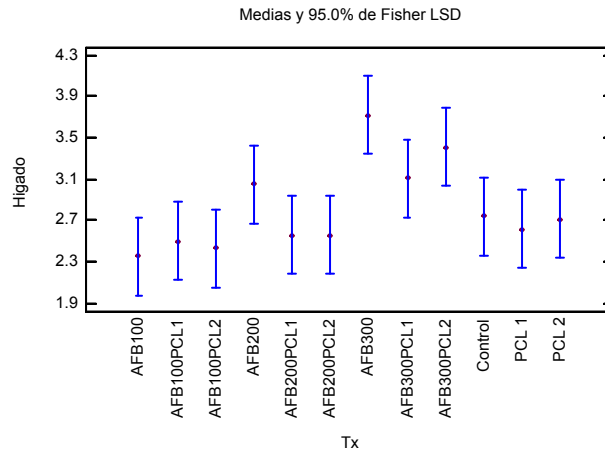
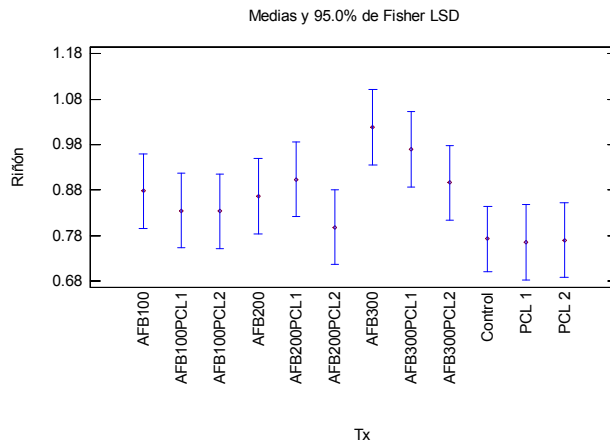


Grafico 14 - Peso de Riñón (%). - mostrando medias y error estándar para pollos de engorda que consumen dietas con AFB y PCL.



11.0 REFERENCIAS

- ¹ SAGARPA. 2011. *Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011- 2020 Subsecretaría de Fomento a los Agro negocios, junio de 2011*
- ² Ávila GE. 1990. *Alimentación de las aves*. 2a ed., México, D.F
- ³ Lastra, M. J. 2000. La producción de carnes en México y sus perspectivas 1990-2000. Dirección general de ganadería o del centro de estadística agropecuaria: <http://www.sagar.gob.mx>.
- ⁴ Lastra, M. J. 2000. *La producción de carnes en México y sus perspectivas 1990-2000*. Dirección general de ganadería o del centro de estadística agropecuaria: <http://www.sagar.gob.mx>.
- ⁵ Lastra, M. J. 2000. *La producción de carnes en México y sus perspectivas 1990-2000*. Dirección general de ganadería o del centro de estadística agropecuaria: <http://www.sagar.gob.mx>.
- ⁶ SAGARPA. 2012, *Programa nacional pecuario 2011-2012*. www.sagarpa.gob.mx
- ⁷ Caballero, J. et al. 2001. Niveles Críticos De Aflatoxina En Muestras De Maíz Para Consumo Animal En Lima Metropolitana. *Rev. Inv.Vet.*Vol. 12. No. 1.
- ⁸ Velásquez. E. 2000. *Estudia control y prevención de micotoxinas en alimentos concentrados para aves y cerdos* CENIAP-FONAIAP.
- ⁹ Deborah C. 2000. *Micotoxicosis*. Revista Plan Agropecuario. Enero-Febrero. p 45-50.
- ¹⁰ Carrillo L. 2002. *Orientación Biológica*. UNAS. Vol. 16. No. 5. ppp 987.
- ¹¹ Lucas V. E., 2001. *Aspectos Generales De Las Micotoxinas, Evaluación Según El Codex alimentarius*. CX/AL 02/21.
- ¹² Salvador Badui.1999. *Química de los Alimentos*. Editorial Pearson Educación. 3ª edic.
- ¹³ Peña. 2002. *Algunas Consideraciones Sobre La Contaminación Por Micotoxinas En Alimentos Agropecuarios En México Y En El Mundo*. Revision. Mexico.
- ¹⁴ Michael et al. 1998. *Mycotoxin Production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium Species*.Vol. 43. pp.141-158.
- ¹⁵ Jiujiang et al. 2000. *Cloning and characterization of avfAand omtBgenes involved in aflatoxin biosynthesis in three Aspergilluspecies*. *Gene* Vol. 248. Pp.157-167.
- ¹⁶ Michael et al. 2000. *The Use of Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for Monitoring Aflatoxin Production in Aspergillus parasiticus 439*. *International Journal of Food Microbiology*.Vol. 56 pp. 97-103.
- ¹⁷ <http://www.merck.com>.
- ¹⁸ *Aspergillus spp.* (described by Micheli ex Link in 1809) <http://www.merck.com>.
- ¹⁹ McEvoy et al. 2002. *Contamination of Animal Feeding Stuffs as a Cause of Residues in Food: a Review of Regulatory Aspects, Incidence and Control*. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 473. pp. 3-26.
- ²⁰ Jaimez et al. 2000. *Laboratorio de Higiene e Inspección de Alimentos*, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. *Journal of Chromatography A*. Vol. 882. pp. 1-10.
- ²¹ Wang et al. 1999. *DNA Damage by Mycotoxins*. *Mutation Research*.Vol 424. pp. 167-181.
- ²² Lin et al. *Thin-layer Chromatography of Mycotoxins and Comparison with other Chromatographic Methods*. *Journal of Chromatography A*, Vol. 815. pp. 3-20.
- ²³ Vincelli et al. 1997. *Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence a Legislation and Activation by Physical Methods* Ismail y. food chemistry. Vol 59 No. 1 pp 57 - 67.
- ²⁴ McEvoy et al. 2002. *Contamination of Animal Feeding Stuffs as a Cause of Residues in Food: a Review of Regulatory Aspects, Incidence and Control*. *Analytic Chimica Acta*. Vol. 473. pp. 3-26.
- ²⁵ Jaimez et al. 2000. *Laboratorio de Higiene e Inspección de Alimentos*, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. *Journal of Chromatography A*. Vol. 882. pp. 1-10.
- ²⁶ Wang et al. 1999. *DNA Damage by Mycotoxins*. *Mutation Research*.Vol 424. pp. 167-181.
- ²⁷ Lin et al. *Thin-layer Chromatography of Mycotoxins and Comparison with other Chromatographic Methods*. *Journal of Chromatography A*, Vol. 815. pp. 3-20.
- ²⁸ Vincelli et al. 1997. *Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence a Legislation and Activation by Physical Methods* Ismail y. food chemistry. Vol 59 No. 1 pp 57 - 67.
- ²⁹ McEvoy et al. 2002. *Contamination of Animal Feeding Stuffs as a Cause of Residues in Food: a Review of Regulatory Aspects, Incidence and Control*. *Analitica Chimica Acta*. Vol. 473. pp. 3-26.
- ³⁰ Jaimez et al. 2000. *Laboratorio de Higiene e Inspección de Alimentos*, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. *Journal of Chromatography A*. Vol. 882. pp. 1-10.
- ³¹ Wang et al. 1999. *DNA Damage by Mycotoxins*. *Mutation Research*.Vol 424. pp. 167-181.
- ³² Lin et al. *Thin-layer Chromatography of Mycotoxins and Comparison with other Chromatographic Methods*. *Journal of Chromatography A*, Vol. 815. pp. 3-20.
- ³³ Vincelli et al. 1997. *Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence a Legislation and Activation by Physical Methods* Ismail y. food chemistry. Vol 59 No. 1 pp 57 - 67.
- ³⁴ McEvoy et al. 2002. *Contamination of Animal Feeding Stuffs as a Cause of Residues in Food: a Review of Regulatory Aspects, Incidence and Control*. *Analytical Chimica Acta*. Vol. 473. pp. 3-26.

- ³⁵Jaimez et al. 2000. *Laboratorio de Higiene e Inspección de Alimentos*, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Journal of Chromatography A. Vol. 882. pp. 1-10.
- ³⁶Wang et al. 1999. *DNA Damage by Mycotoxins*. Mutation Research. Vol 424. pp. 167-181.
- ³⁷Lin et al. *Thin-layer Chromatography of Mycotoxins and Comparison with other Chromatographic Methods*. Journal of Chromatography A, Vol. 815. pp. 3-20.
- ³⁸Vincelli et al. 1997. *Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence and Legislation and Activation by Physical Methods*. *Ismael y. food chemistry*. Vol 59 No. 1 pp 57 - 67.
- ³⁹Smith et al. 1994. *Dietary Hydrated Sodium Calcium Alumino Silicate Reduction of Aflatoxins M₁ residue in Dairy Goat Milk and Effects on Milk Production and Components*. Journal of Animal Science. Vol. 72. pp. 677-682.
- ⁴⁰Carrillo. L. 2002. *Microbiología Agrícola*. España.
- ⁴¹Jaramillo M. *Nutrición-Micotoxicología*. E.U
- ⁴²Jaimez et al. 2000. *Application of the Assay of Aflatoxins by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection in Food Analysis*. Journal of Chromatography A, 882 pp. 1-10.
- ⁴³Zeringue et al. *Effects of Volatile Aldehydes from Aspergillus-resistant Varieties of Corn on Aspergillus parasiticus Growth and Aflatoxin Biosynthesis*. *Toxicon*. Vol. 38 pp. 1215-1223.
- ⁴⁴Jaimez et al. 2000. *Application of the Assay of Aflatoxins by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection in Food Analysis*. Journal of Chromatography A, 882 pp. 1-10.
- ⁴⁵Sumano. H. 1997. *Farmacología Veterinaria*. McGraw Hill Interamericana. Segunda Edición. México
- ⁴⁶Salvat. 1997. *Diccionario Terminológico De Ciencias Médicas*. Salvat editores. 12 edición. México.
- ⁴⁷Gimeno. A. 1999. *Residuos de Micotoxinas en Leche, Huevos y Tejidos Comestibles de Aves, Cerdos y Rumiantes*. USA. www.mycotoxin.com.
- ⁴⁸Alvares et al. 2000. *Aductos-ADN-aflatoxina como Bio-marcadores de Exposición en Grupos de Riesgo de Cáncer de Hígado*. *Rev Cubana Oncol*. Vol 19. pp. 35-39
- ⁴⁹Clifford et al. 1966. *Aflatoxin: A Site of Action in the Rat Liver Cell*. *Nature*. Vol. 209. pp. 312-315.
- ⁵⁰Ellis et al. 1991. *Aflatoxins in Food: Occurrence, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of control*. *Food science and nutrition*. Vol. 30 pp. 403-439.
- ⁵¹Betina V. 1989. *Biological Aspects of Micotoxinas*. Elsevier. Cap. 3 pp. 42,50,52,101,433.
- ⁵²Jia-Sheng et al. 1999. *DNA Damage by Mycotoxins*. Mutation Research. Vol. 424. pp. 167-181.
- ⁵³Eaton et al. 1994. *Biotransformation of Aflatoxins In: The toxicology of Aflatoxins*. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. pp. 45-71.
- ⁵⁴Müller, H. M. 1984. *A Survey of Methods of Decontaminating Mycotoxins*. *Animal Research and Development* Vol. 19 pp. 7-37.
- ⁵⁵Jia-Sheng et al. 1999. *DNA Damage by Mycotoxins*. Mutation Research. Vol. 424. pp. 167-181.
- ⁵⁶Alvares et al. 2000. *Aductos-ADN-aflatoxina como Bio-marcadores de Exposición en Grupos de Riesgo de Cáncer de Hígado*. *Rev Cubana Oncol*. Vol 19. pp. 35-39.
- ⁵⁷Shrirang et al. 1997. *Ascorbic Acid Protects Guinea Pigs from Acute Aflatoxin Toxicity*. *Toxicology and applied pharmacology* Vol. 143. pp. 429-435.
- ⁵⁸Betina V. 1989. *Biological Aspects of Micotoxinas*. Elsevier. Cap. 3 pp. 42,50,52,101,433.
- ⁵⁹Coulombe, R. A. 1994. *Non-hepatic Disposition and Effects of Aflatoxin B₁. The Toxicology of Aflatoxins*. Academic Press. pp. 89-101 EU.
- ⁶⁰Quezada. et. al. 2000. *Effects of Aflatoxin B₁ on the Liver and Kidney of Broiler Chickens during Development*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 125. pp 265-272.
- ⁶¹Deborah, C. 2000. *Micotoxicosis*. *Revista Plan Agropecuario*. Enero-Febrero. p 45-50.
- ⁶²Lucas, V. 2001. *Aspectos Generales de las Micotoxinas, Evaluación según el Codex alimentarius*. CX/AL 02/21.
- ⁶³Ferber, P. et al. 1997. *Detection de Aflatoxigenic Fungi in figs by a PCR Reaction*. Federal research centre for nutrition Eengesserstr 20 Karlsruhe. Germany.
- ⁶⁴Mei-chin, Y. et al. 1999. *Inhibitory Effect of Seven Allium Plants upon three Aspergillus Species*. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 49. pp. 49-56
- ⁶⁵Kusumoto. 1998. *Transcript of a Homolog of aflR, a Regulatory Gene for Aflatoxin Synthesis in Aspergillus parasiticus, Was not Detected in Aspergillus oryzae Strains*. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 169 pp. 303-307.
- ⁶⁶Quezada. et. al. 2000. *Effects of Aflatoxin B₁ on the Liver and Kidney of Broiler Chickens during Development*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 125. pp 265-272
- ⁶⁷Guo-Jane et al. 1999. *Detecting Aspergillus parasiticus in Cereals by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 50. pp. 181-189.
- ⁶⁸Velásquez C. 2000. *Análisis de Micotoxinas Amino polihidratadas*. Servei de publicació universitat de Lleiva salamanca, 1-70 pp. España
- ⁶⁹Ramos et al. 1997. *Prevention of Aflatoxicosis in Faro Animals by means Hidrataded Sodium Calcium Alumino Silicated Addition to Feed stuffs*. *Animal feed science and tecnology* .Vol. 65. pp. 197-206.
- ⁷⁰Bresler et al. 1998. *Amaranth Grain as Substrate for Aflatoxin and Zearalenone Production at Different Water Activity Levels*. *International Journal of Food Microbiology* Vol. 42 pp. 57-66.

- ⁷¹ Gimeno A. 2000. *Revisión Genérica del Problema de los Hongos y de las Micotoxinas en la Alimentación Animal*. España.
- ⁷² Jia-Sheng et al. 1999. *DNA damage by Mycotoxins*. Mutation Research. Vol. 424. pp. 167–181.
- ⁷³ Rajmon et al. 2001. *Combined Effects of Repeated low doses of Aflatoxin B1 and T-2 toxin on the Chinese Hamster*. Vet. Med. Vol. 46. pp. 301–307.
- ⁷⁴ Iheukwumere et al. 2003. *Physiological Responses of Broiler Chickens to Quantitative Water Restrictions: Hematology and Serum Biochemistry*. International Journal of Poultry Science. Vol.2 pp. 117-119.
- ⁷⁵ Kanashiroet al. 2001. *Influência da Administração Contínua de Probiótico a Frangos de Corte sobre Atividades Enzimáticas Séricas e Concentração de Colesterol Sérico*. Arq. Inst. Biol. Vol. 68. No.2, pp.11-17.
- ⁷⁶ Ogus et al. 2002. *Evaluation of Biochemical Charactes of Broiler Chickens during Dietary Aflatoxin 50 and 100 ppb and Clinoptiolite Exposure*. Research a veterinary science Vol. 73, pp. 101 -103.
- ⁷⁷ Chang, C. F., H. Y. Chen, M. S. Su, and I. C. Liao. 2000. *Immunomodulation by Dietary beta 1, 3-glucan in the Brooders of the Black tiger Shrimp Penaeusmonodon*. Fish Shell fish Immunol. 10:505–514.
- ⁷⁸ Qureshi, et al. 1998. *Understanding Immunology in Disease Development and Control*. Poult.Sci. 77: 1126-1129.
- ⁷⁹ Murray, et al. 1987a. *Effect of Adrenocorticotropinand Dietary Ascorbic Acid on Cutaneous Basophile hypersensitivity to Phytohemagglutinin in Chickens*. Poultry Sci. 66:1846–1852.
- ⁸⁰ Thaxton, J. P., J. Gilbert, P. Y. Hester, and J. Brake. 1982. *Mercury Toxicity as Compared to Adrenocorticotropin Induced Physiological Stress in the Chicken*. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 11:509–514.
- ⁸¹ Stewart, G, G, and I. Russell. 1998. *An Introduction to Brewery Science & Technology*. Series III. Brewer's yeast. The institute of brewing, 33 Clarges street, London W1Y 8EE, England.
- ⁸² Sharma, M. H. Hinton, and M. R. Bedford, 2000. *Diet Influences the Colonization of Campylobacter jejuni and Distribution of Mucin Carbohydrates in Chick Intestinal Tract*. Cell. Mol. Life Sci. 57: 1793-1801.
- ⁸³ Jaimez et al. 2000. *Application of the Assay of Aflatoxins by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection in Food Analysis*. Journal of Chromatography A, 882 pp. 1–10.
- ⁸⁴ Tsai et al. 1999. *Detecting Aspergillus parasiticus in Cereals by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 50. pp.181–189.
- ⁸⁵ Tanaka et al. 2000. *Short Communication Simultaneous Determination of Trichothecene Mycotoxins and Zearalenone in Cereals by Gas Chromatography–mass Spectrometry*. Journal of Chromatography A, Vol. 882. pp.23–28.
- ⁸⁶ Lin et al. 1998. *Thin-layer Chromatography of Mycotoxins and Comparison with Other Chromatographic Methods*. Journal of Chromatography A, Vol. 815. pp. 3–20.
- ⁸⁷ Otta et al. 2000. *Determination of Aflatoxins in Food by Overpressured-layer Chromatography*. Journal of Chromatography A, Vol. 882. pp. 11–16.
- ⁸⁸ Christensen et al. 1969. *The Role of Storage Fungi in the Loss of Quality*. In: Grain Storage. University of Minnesota pp.153 USA
- ⁸⁹ Moreno, M. E. 1996. *El Maíz y las Aflatoxinas en la Industria de la Masa y la Tortilla: Desarrollo y Tecnología*. PUAL-UNAM. Pp.139-145.
- ⁹⁰ Diener et al. 1966. *Aflatoxin Production by Isolates of Aspergillus flavus*. Phytopathology. Vol. 56. pp. 1390-1393.
- ⁹¹ Fuller, R. 1973. *Ecological Studies on the Lactobacillus Flora Associated with the Crop epithelium of the Fowl*. J. Appl. Bacteriol. 36: 131-139.
- ⁹² Glen r. et al, *Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebitics, In the Journal of Nutrition* 125: 1401-01402-1995
- ⁹³ Gonzalez, A. y L. Valenzuela. 2006. *Saccharomyces cerevisiae*. http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_20/Capitulo20.pdf. Accessed Aug. 2006.
- ⁹⁴ Stewart, G, G, and I. Russell. 1998. *An Introduction to Brewery Science & Technology*. Series III. Brewer's yeast. The institute of brewing, 33 Clarges street, London W1Y 8EE, England.
- ⁹⁵ Mewes, H. W., K. Alberman, M. Bahr, D. Frishmann, A. Gleissner, J. Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maieri, S. G. Oliver, F. Pfeifer, and A. Zollner. 1997. *Overview of the Yeast Genome*. Nature. 387: 7-9
- ⁹⁶ Castagliuolo, L., M. F. Riegler, L. Valenick, and J. T. Lamont, and C. Pothoulakis. 1999b. *Saccharomyces boulardii Protease Mediates Clostridium difficiletoxin A and B Effects in Human Colonic Mucosa*. Infect. Immun. 67: 302-307.
- ⁹⁷ Cuaron, I. J. A. 2000. *La Influencia de la Levadura en la Dieta, Respuesta Microbiológica Antagonista*. Proc. Anais do Simpósio sobre Aditivos Alternativos na Nutrição Animal. 16-17 agosto, 2000. Campinas. SP
- ⁹⁸ Newbold, C.J. 1996. *Probitics for Ruminants*. Ann. Zootech. 45, Suppl.: 329-335.
- ⁹⁹ Van Vuuren, A. M. 2003. *Effect of Live Yeast on the Performance of Dairy Cows*. Pages 41-48 in Role of probiotics and their link to the demands of European consumers. 11 February 2003, ID-Lelisted report 03/0002713.
- ¹⁰⁰ Nitta, K., and F. Kobayashi. 1999. *Brewer's Yeast as Health Foodstuff*. New Food Ind.(Japan). 41: 17-23.
- Noack, J., B. Kleessen, A.
- ¹⁰¹ Oriol, E. 2004. *SAF-Mannan: Origen, Producción y Análisis*. CD in VI Seminario Internacional (Microbiología aplicada a Nutrición Animal). Lesaffre Feed Additives/Saf Agri. Nov. 4, Veracruz, México.
- ¹⁰² Stone, C. W. 2006. *Yeast Products in the Feed industry. A Practical Guide for Feed Professionals*. <http://www.diamondv.com/articles/booklet/booklet.html>. Accessed Apr. 2006.
- ¹⁰³ Adams, C. A. 2004. *Nutricines in Poultry Production: Focus on Bioactive Feed Ingredients*. Nutrition Abstracts and Reviews: Series B. 74: 1N-12N.
- ¹⁰⁴ Romero, R., and J. Gomez-Basauri. 2003. *Yeast and Yeast Products, Past, Present and Future: From Flavour to Nutrition and Health*. Pages 365-371 in Beyond the tornado natural technologies: The calm after the storm. Nutritional biotechnology in the feed and food industries. T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

- ¹⁰⁵ Oriol, E. 2004. *SAF-Mannan: OriPgen, Producción y Análisis*. CD in VI Seminario Internacional (Microbiología aplicada a Nutrición Animal). Lesaffre Feed Additives/Saf Agri. Nov. 4, Veracruz, México.
- ¹⁰⁶ Romero, R., and J. Gomez-Basauri. 2003. *Yeast and Yeast Products, Past, Present and Future: From Flavour to Nutrition and Health*. Pages 365-371 in Beyond the tornado natural technologies: *The Calm after the Storm. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- ¹⁰⁷ Orlans, E., and M. E. Rose. 1970. *Antibody Formation by Transferred Cell in Inbred Fowls*. Immunology. 18: 473-482.
- ¹⁰⁸ Osumi, M. 1998. *The Ultrastructure of Yeast: Cell Wall Structure and Formation*. Micron. 29: 207-233.
- ¹⁰⁹ Klis, F., P. Mol, K. Hellingwerf, and S. Brul. 2002. *Dynamic of Cell Wall Structure in Saccharomyces Cerevisiae*. FEMS Microbiol.Rev. 26: 239-256.
- ¹¹⁰ Aguilar-Uscanga, B., and J. M. François. 2003. *A Study of the Yeast Cell Wall Composition and Structure in response to growth conditions and mode of cultivation*. Lett. Appl. Microbiol. 37: 268-274.
- ¹¹¹ Fleet, G. H. 1991. *Cell Walls*. Pages 199-277 in *The Yeasts*, 2nd edn, vol 4, A. H. Rose, and J. S. Harrison, eds. Academic Press, New York.
- ¹¹² Nguyen et al. 1998. *Composition of The Cell Wall of Several Yeast Species*. App. Microbiol. Biotechnol.50: 206-212.
- ¹¹³ Aguilar-Uscanga, B., and J. M. François. 2003. *A Study of the Yeast Cell Wall Composition and Structure in Response to Growth Conditions and Mode of Cultivation*. Lett. Appl. Microbiol. 37: 268-274.
- ¹¹⁴ Klis, F. M. 1994. Review: cell wall assembly in yeast. Yeast. 10: 851-869.
- ¹¹⁵ Morris, G.J., L. Winters, G. E. Coulson, and K. J. Clarke. 1986. *Effect of Osmotic Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 132: 2023-2034.
- ¹¹⁶ Kollár, R., B. B. Reinhold, E. Petráková, H. J. C. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonová, J. C. Kapteyn, F. M. Klis, and E. Cabib. 1997. *Architecture of Yeast Cell Wall: α -1-6)-glucan Interconnects Manno-protein, α -(1-3)-glucan, and Chitin*. J. Biol. Chem. 272: 17762-17775.
- ¹¹⁷ Morris, G.J., L. Winters, G. E. Coulson, and K. J. Clarke. 1986. *Effect of Osmotic Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 132: 2023-2034.
- ¹¹⁸ Osborn, H.M.I. and Khan, T.H. 2000. *Oligosaccharides : Their Synthesis and Biological Roles*. Oxford Chemistry Masters, OUP, 2000.
- ¹¹⁹ Kocher, A. 2005. *Glycomics The New Frontier in Poultry Nutrition*. Pages 53-56 in *Proc. 17th Annual Australian Poultry Science Symposium. The Poultry Research Foundation U. Sydney, World's Poultry Science Association Australian Branch*. 7-9 february, 2005. Sydney, New South Wales.
- ¹²⁰ Hooge, D. M. 2004. *Meta-analysis of Broiler Chicken Pen Trials Evaluating Dietary Mannan- oligosaccharide, 1993-2003*. Int. J. Poult. Sci. 3:163-174.
- ¹²¹ Rosen, G. D. 2006. *Holo-Analysis*. Poult. Sci. 85: 957-959.
- ¹²² Ferket, P. R., C. W. Parks and J. L. Grimes. 2002. *Benefits of Dietary Antibiotic and Mannan-oligosaccharide Supplementation for Poultry*. 22 Pages. In: Proc. Multi-State Poult. Feeding and Nutr.Conf., Indianapolis, Indiana USA. May14-16. http://etd.fcla.edu/UF/UFE0004720/spearman_k.pdf. Accessed June 14, 2004.
- ¹²³ Pettigrew, J. E. 2000. *Mannan-oligosaccharides Effects on Performance Reviewed*. Feedstuffs.25: 12-14.
- ¹²⁴ Hooge, D. M. 2004. *Meta-analysis of Broiler Chicken Pen Trials Evaluating Dietary Mannan -oligosaccharide, 1993-2003*. Int. J. Poult. Sci. 3:163-174.
- ¹²⁵ Pettigrew, J. E. 2000. *Mannan-oligosaccharides Effects on Performance Reviewed*. Feedstuffs. 25: 12-14.
- ¹²⁶ Waldroup, P. W., E. O. Oviedo-Randon and C. A. Fritts. 2003b. *Comparison of Bio Mos® and Antibiotic Feeding Program in Broiler Diets Containing Copper Sulphate*. Int. J. Poult. Sci. 2: 28-31.
- ¹²⁷ Perry, F. G. 1995. *Biotechnology in Animal Feeds and Feeding, An Overview*. Pages 1-15. R. J. Wallace and A. Chesson, eds. VCH Verlagsgesellschaft, Wienheim and New York.
- ¹²⁸ Perry, F. G. 1995. *Biotechnology in Animal Feeds and Feeding, An Overview*. Pages 1-15. R. J. Wallace and A. Chesson, eds. VCH Verlagsgesellschaft, Wienheim and New York.
- ¹²⁹ Aguilar-Uscanga, B., and J. M. François. 2003. *A Study of the Yeast Cell Wall Composition and Structure in Response to Growth Conditions and Mode of Cultivation*. Lett. Appl. Microbiol. 37: 268-274.
- ¹³⁰ Raa, J. 2003. *The Use of Immune-stimulant to Enhance Disease Resistance and Growth Performance of Fish and Shrimp*. Pages 67-75 in XI Congreso nacional de AMENA y I Congreso Latino-Americano de nutrición animal. Cancún, Qroo (México).
- ¹³¹ Hernández, P., O. Martín, Y. Rodríguez, y F. GANEM. 1999. *Aplicaciones de las Lectinas*. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 15:91-5.
- ¹³² Laine, T., M. Yliaho, V. Myllys, T. Pohjanvirta, M. Fossi, and M. Anttila. 2004. *The Effect of Antimicrobial Growth Promoter with Drawal on the Health of Weaned pigs in Finland*. Prevent. Vet. Medicine. 66: 163-174.
- ¹³³ Spring, P., C. Wenk, A. K. Dawson, and E. K. Newman. 2000. *The Effects of dietary Mannan-oligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentrations of Enteric bacteria in the Ceca of Salmonella-challenged Broilers Chicks*. Poult. Sci. 79:205-211.
- ¹³⁴ Gil de Los Santos, J. R., O. B. Storch, and C. Gil-Turnes. 2005. *Bacillus cereus var. toyoi and Saccharomyces oulardiinii Creased feed Efficiency in Broilers Infected with Salmonella enteritidis*. Br. Poult. Sci. 46: 494-497.
- ¹³⁵ Oyofe, B. A., J. R. DeLoach, D. E. Corrier, J. O. Norman, R. L. Ziprin, and H. H. Mollenhauer. 1989a. *Effect of Carbohydrates on Salmonella typhimurium Colonization in Broiler Chickens*. Avian Dis. 33:531-534
- ¹³⁶ Oyofe, B. A., J. R. DeLoach, D. E. Corrier, J. O. Norman, R. L. Ziprin, and H. H. Mollenhauer. 1989b. *Prevention of Salmonella typhimurium Colonization of Broilers with D-mannose*. Poultry Sci. 68:1357-1360.
- ¹³⁷ Spring, P., C. Wenk, A. K. Dawson, and E. K. Newman. 2000. *The Effects of Dietary Mannan-oligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentrations of Enteric Bacteria in the Ceca of Salmonella-challenged Broilers Chicks*. Poult. Sci. 79:205-211.
- ¹³⁸ Fernandez, F., M. Hilton, and B. Van Gils. 2000. *Evaluation of the Effect of Mannan-oligosaccharides on the Competitive Exclusion of Salmonella enteritidis Colonization in Broiler Chicks*. Avian Pathol.29:575-581.

- ¹³⁹ Fernandez, F., M. Hilton, and B. Van Gils. 2002. *Dietary Mannan-oligosaccharides and their Effect on Chicken Caecal Microflora in Relation to Salmonella enteritidis Colonization*. Avian Pathol.31:49-58
- ¹⁴⁰ Yianninkouris, A., J. Francois, L. Poughon, C. G. Dussap, G. Bertin, G. Jeminet, and J. P. Jouany. 2004. *Adsorption of Zearalenone by Beta-D-glucans in the Saccharomyces cerevisiae Cell Wall*. J. Food Prot. 67: 1195-1200
- ¹⁴¹ Ringot, D., B. Lerzy, J. P. Bonhoure, E. Auclair, E. Oriol, and Y. Larondelle. 2005. *Effect of Temperature on In Vitro Ochratoxin A Biosorption on to Yeast Cell Wall Derivates*. Process Biochem.40: 3008-3016.
- ¹⁴² Pier A.C., and J.L.Richard. 1992. *Mycoses and Mycotoxicoses of Animals Caused by Aspergilli*. Biotechnol. 23: 233-248.
- ¹⁴³ Pfohl-Leszkowicz A. 2000. *Risques Mycotoxicologiques pour la Santé des Animaux et de l'homme*. Cah. Nutr. Diét. 35: 389-397.
- ¹⁴⁴ Veldman, B. 2004. *Mycotoxins in the Animal Production Chain*. Pages 275-280 in *Meeting the Mycotoxin Menace*. D. Barug, H. van Egmond, R. López-García, T. van Osenbruggen, and A. Visconti, eds. Wageningen Academia Publishers. P. O. Box 220, NL-6700 AE Wageningen, The Netherlands.
- ¹⁴⁵ Stanley, V. G., C. Brown, and A. Sefton. 2000. *Comparative Evaluation of a Yeast Culture, Mannan-oligosaccharides and an Antibiotic on Performance of Turkeys*. Poult. Sci. Annual Meeting Abstracts. Poscal 79 Suppl. 1: 117 Abst.
- ¹⁴⁶ Santin, E., A. Maiorka, M. Macari. 2001. *Performance and Intestinal Mucosa Development of Broilers Chickens fed Diets containing Saccharomyces cerevisiae cell wall*. J. Appl. Poult. Res. 10:236-244.
- ¹⁴⁷ Stanley, V. G., C. Gray, M. Daley, W. F. Krueger, and A. E. Sefton. 2004. *An Alternative to Antibiotic-based Drugs in Feed for Enhancing Performance of Broilers grown on Eimeria spp.-Infected litter*. Poult. Sci. 83:39-44.
- ¹⁴⁸ Zaghini, A., G. Martelli, M. Roncada, M. Simioli, and L. Rizzi. 2005. *Mannan-oligosaccharides and Aflatoxin B1 in Feed for Laying Hens: Effects on Egg Quality, Aflatoxins B1 and M1 Residues on Eggs, and Aflatoxin B1 in liver*. Poult. Sci. 84:825-832.
- ¹⁴⁹ Chowdhury, S. R., and T. K. Smith. 2005. *Effects of Feeding Grains Naturally Contaminated with Fusarium Mycotoxins on Hepatic Fractional Protein Synthesis Rates of Laying Hens and the Efficacy of a Polymeric Glucomannan Mycotoxin Adsorbent*. Poult. Sci. 84:1671-1674.
- ¹⁵⁰ Muñoz et al. 2008. *Pigmentación en la Piel de Pollos de Engorda con Diferentes Niveles de Xantofilas en Dietas sorgo-soya*. UNAM, Temario alimentación de las aves.
- ¹⁵¹ N. A. LEE, 2005 *Validation of Analytical Parameters of a Competitive Direct ELISA for Aflatoxin B1 in peanuts*.
- ¹⁵² Peña et al. 1990. *Efecto Tóxico de las Aflatoxinas en la Dieta*. Ciencia y Desarrollo. Vol. 16. pp. 61-72.
- ¹⁵³ Betina, V.1989. *Biological Aspects of Micotoxinas*. Chap.3 *Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier.. p. 42, 50, 52, 101, 433. U.S.A
- ¹⁵⁴ Moreno et al. 2000. *Uso de Sales del Acido Propionico para Inhibir la Producción de Aflatoxinas en Grano Almacenados de Maiz*. Agrociencia 34: 477-484. .
- ¹⁵⁵ Benites V. et al. 2007. *Evaluación de Oligosacáridos ñ mananos: BioMos y Safmannan en la Productividad de Pollos de Engorda*. Honduras.
- ¹⁵⁶ **Ross 308 Manual Broiler Performance adjectives TIENE AUTOR?**
- ¹⁵⁷ Quintana, 1991, *Avitecnia: Manejo de las Aves Domésticas Más Comunes*, Trillas. 2da edición, México.
- ¹⁵⁸ **Manual de Pollo de Engorda Ross308 TIENE AUTOR?**
- ¹⁵⁹ **LABORATORIOS MAVER, S.A. de C.V. Av. División del Norte No. 2830, Colonia Parque San Andrés, Regs. SAGARPA-B-0789-005 y B-0789-002**
- ¹⁶⁰ Valdivia et al. 2008, *Toma, Conservación y Envío de Muestras para el Laboratorio Clínico Veterinario*, 1ª edición. México
- ¹⁶¹ *Método Colorimétrico para la Determinación de Proteínas Totales en Suero*, Winer-Lab
- ¹⁶² *Método Colorimétrico para la Determinación de Albúmina en Suero*, Winer-Lab
- ¹⁶³ De la Sota, 2004, *Manual de Procedimientos de Enfermedad de Newcastle*, SENASA. Argentina pp 20-22
- ¹⁶⁴ Martínez. 2006. *Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología*. UNAM. México
- ¹⁶⁵ Cardenti et al, 2006, *Manual de Técnicas de Necropsia para Patología General*. UNAM; México
- ¹⁶⁶ Thomson. *Guelph., 2005 Canadá. Traducido y adaptado por G. Valero, INIFAP, México. Corregido por G. Valero, IMSS, México*
- ¹⁶⁷ Montalvo, 2010, *Técnica Histológica*. Ficha. UNAM. Facultad de Medicina
- ¹⁶⁸ Varaya, 1994, *Hipersensibilidad cutánea retardada y riesgo de desarrollo de tuberculosis en personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana*, tesis Doctoral, Complutense Madrid España.
- ¹⁶⁹ Gomez et al, 2009, *Comportamiento Productivo y Respuesta Inmune de Pollos Alimentados con Dietas sorgo-soya con y sin Aflatoxina y Paredes Celulares de Levadura (Saccharomyces cerevisiae)*, Técnica pecuaria México, 2009;47(3):285-297
- ¹⁷⁰ *Método UV optimizado (IFCC) Determinación de Aspartato-amino-transferasa (GOT/AST) en Suero o Plasma*, Wiener-Lab
- ¹⁷¹ *Método UV optimizado (IFCC) Determinación de Alanina-amino-transferasa (GPT/ALT) en Suero o Plasma*, Wiener-Lab
- ¹⁷² *Método UV optimizado (SFBC) Determinación de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en Suero o Plasma*, Wiener-Lab
- ¹⁷³ *Método Cinético Optimizado (DGKC y SSCC) a 405 nm; Determinación de Fosfatasa Alcalina, Método Colorimétrico para la Determinación de Proteínas Totales en Suero*
- ¹⁷⁴ Muñoz et al. *Evaluación de la Pigmentación Cutánea del Pollo de Engorda Alimentado con Diferentes Niveles de Energía Metabolizable*
- ¹⁷⁵ Konica Minolta / sensinamerica, *Manual Products 2012*
- ¹⁷⁶ Universidad de Granada, *Temario 7 Comparaciones Múltiples*, España 2012
- ¹⁷⁷ Acebedo, et al. 2011. *Verificación de los Métodos para el Análisis Proximal en leche entera en el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Tesis.

-
- ¹⁷⁸ Mariam G. Eshak et al. 2010. Effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on reduction of aflatoxicosis, enhancement of growth performance and expression of neural and gonadal genes in Japanese quail. *Journal of American Science*, 2010;6(12) Egypt
- ¹⁷⁹ Arce, et al. 2005. Efecto de paredes celulares (*Saccharomyces cerevisiae*) en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos, *TEC PECU MEX* 2005;43(2):155-162.
- ¹⁸⁰ Keller K.M. 2012. Efeito de parede celular de levedura sobre o desempenho produtivo de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B1. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34 (2):101-105, 2012.
- ¹⁸¹ 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.
- ¹⁸² William et al. 1990. Patología Clínica Veterinaria, editorial UTEHA, México.
- ¹⁸³ Sandoval et al. 1999. Respuesta al estrés físico y la hepatoprotección continúa en pollos. *Arch, Zootec.* 48, 395-404.
- ¹⁸⁴ Arana et al. 2002. Differential effect of chronic aflatoxin B1 intoxication on the growth performance and incidence of hepatic lesions in triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Med. Vet.*, Vol. XXXIV, Nº 2, 2002, pp. 253-263
- ¹⁸⁵ Mallmann et al. 2007. Micotoxinas en ingredientes para alimento balanceado de aves. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura | Brasil 2007 | Porto Alegre | del 25 al 28 de septiembre.
- ¹⁸⁶ OIE 2012. Manual terrestre 2012. Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2012.
- ¹⁸⁷ Saume et al 2006. Efecto de diferentes niveles de aflatoxina B, sobre la respuesta inmune del pollo de engorde. *Veterinaria Trop.* 31(1-2): 7-18. 2006
- ¹⁸⁸ Yiannikouris 2008. Impacto de las Micotoxinas sobre la Función Gastrointestinal: Uso de las Propiedades Secuestrantes de los Glucanos de la Pared Celular de *Saccharomyces cerevisiae* para Contrarrestar este Riesgo 57th Western Poultry Disease Conference/XXXIII ANECA
- ¹⁸⁹ Ezquerro-Brauer et al. 2011. Micotoxinas y Fosfatasa Alcalina de Camarón Cultivado. Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 105-116.
- ¹⁹⁰ Sánchez G.V 2009. Congreso XXVI Congreso Anual de AMVAC. Madrid Revista. pp 4-6
- ¹⁹¹ Pérez-Arevalo et al. 2012. Lesiones en pollitos recién nacidos causadas por aflatoxina B1 transmitida vía transovárica. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXII, Nº 3, 217 - 224, 2012*
- ¹⁹² Arrieta et al. 2006. Efecto del alimento contaminado con aflatoxina B1 (0, 07 mg/kg) sobre la morfología hepática y actividad, enzimática sérica (AST y ALT) en pollos de engorde. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVI, Nº 1, 39 - 47, 2006*
- ¹⁹³ Álvarez et al. 2000. Aductos-adn-aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. *Rev Cubana Oncol* 2000;16(1):35-9
- ¹⁹⁴ Colombie et al. 2004 Nicotinic acid controls lactate production by K1-LDH: a *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing a bacterial LDH gen. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* June 2004, Volume 31, Issue 5, pp 209-215.
- ¹⁹⁵ Mallmann et al. 2009. Micotoxinas inmunidad y conceptos. Informe traducido por Dra. Martha Pulido L. MV.MSc Profesora Asistente Universidad Nacional de Colombia.
- ¹⁹⁶ Marquez-Gonzalez.2002. Efecto de las micotoxinas en la producción pecuaria y alternativas de solución con productos derivados de las levaduras. Trabajo Presentado en el V Seminario Internacional de Microbiología Aplicada a la Nutrición Animal, Guadalajara.
- ¹⁹⁷ Pérez-Arevalo et al. 2012. Lesiones en pollitos recién nacidos causadas por Aflatoxina B1 transmitida vía transovárica. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXII, Nº 3, 217 – 224.*