

01672
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION

EVALUACION DE SECUESTRANTES DE
MICOTOXINAS PARA REDUCIR LA TOXICIDAD EN
DIETAS PARA POLLO DE ENGORDA
CONTAMINADAS CON CULTIVOS DE *Aspergillus*
ochraceus y *Fusarium tricinctum* PRODUCTORES DE
OCRATOXINA Y TOXINA T-2

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
MVZ ARTURO RICARDO GARCIA MORALES



TUTOR PRINCIPAL: MSc ERNESTO AVILA GONZALEZ
COMITE TUTORAL: MSc RENE ROSILES MARTINEZ
DR. ERNESTO MORENO MARTINEZ
COLABORADOR INVITADO: MI JORGE LECUMBERRI LOPEZ

MEXICO, D.F.

MARZO DE 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DECLARACIÓN

Doy mi consentimiento a la división de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que esta tesis sea disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Atentamente



MVZ ARTURO RICARDO GARCÍA MORALES

DEDICATORIA:

A mis padres, por todo lo que me han dado

A mi esposa, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por su comprensión y paciencia.

A mi hijo, por ser un motivo para superarme.

A mis suegros y a la Sra. Dolores Ávila, por toda su confianza y apoyo incondicional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS:

A CONACYT y a la Dirección General de Estudios de Postgrado, por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola, al Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, y al Departamento de Producción Animal: Aves, por todo el apoyo brindado para la realización de los experimentos

A todas las siguientes personas hago un reconocimiento por su colaboración de alguna u otra manera, esperando no omitir algún nombre. Sin ellos la culminación de la tesis y de mis estudios de maestría no hubiese sido posible:

A mi tutor principal, Dr. Ernesto Avila González, por su apoyo incondicional, confianza, orientación y consejo. Por sus atinados comentarios y sus enseñanzas.

Al Dr. René Rosiles, muy especialmente por su orientación, paciencia, tiempo y la ayuda que me brindó en todo momento.

Al Dr. Victor Petrone por su colaboración en la parte de patología. Por su ayuda y amistad.

Al Dr. Jorge Lecumberri por su colaboración en la parte estadística de éste trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Irma Tejada y Dr. Ernesto Moreno, por sus comentarios y sugerencias para enriquecer éste trabajo

Al personal académico del CEIEPA, nuevamente, por su apoyo A Rene Morales por su amistad y compañerismo y a Oscar Olivares por la ayuda recibida.

Al personal honorario del Departamento de Aves que colaboró en la realización de la parte experimental de ésta tesis: Ruth, Rodrigo, Juan Carlos, Ulises, Libia y todos los que colaboraron conmigo. Muy en especial a la Dra. Mireya Juárez por su amistad y ayuda incondicional en toda ocasión que la necesité, y a la Dra. Xóchitl Hernández. Sin ustedes no hubiese sido posible finalizar la tesis.

Al Laboratorio de Micología, y en especial al Dr. Roberto Cervantes por su apoyo para el desarrollo de las cepas de hongos utilizadas en el estudio para la producción de micotoxinas.

Al laboratorio de micotoxinas de INIFAP Palo Alto, en especial al Dr. René Marquez por el apoyo para la cuantificación de las micotoxinas

Al QFB Emilio Eslava y al Dr. Janitzio Bautista, del Laboratorio de Toxicología, por su apoyo en las mediciones de micotoxinas y minerales.

A los laboratorios BIOMIN por el apoyo económico parcial para la realización de la prueba biológica

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

Contenido	I
Resumen	III
Summary	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Marco contextual	4
1.1.1 Situación actual de la industria avícola y las micotoxinas en México	5
1.2 Marco teórico	6
1.2.1 Micotoxinas	6
1.2.2 Ocratoxinas	7
1.2.2.1 Definición y estructura	7
1.2.2.2 Epidemiología	7
1.2.2.3 Características de <i>Aspergillus ochraceus</i>	8
1.2.2.4 Toxicocinética de ocratoxina A	8
1.2.2.5 Mecanismo de acción	9
1.2.2.6 Signología clínica	10
1.2.2.7 Lesiones macroscópicas	11
1.2.2.8 Lesiones microscópicas	11
1.2.2.9 Patología clínica	11
1.2.3 Tricotecenos	12
1.2.3.1 Definición y estructura	12
1.2.3.2 Epidemiología	13
1.2.3.3 Características de <i>Fusarium tricinctum</i>	14
1.2.3.4 Biosíntesis	14
1.2.3.5 Toxicocinética de T-2	15
1.2.3.6 Mecanismo de acción	16
1.2.3.7 Patología macroscópica	17
1.2.3.8 Lesiones microscópicas	18
1.2.3.9 Patología clínica	18
1.2.4 Reducción de la toxicidad de las micotoxinas	19
1.2.4.1 Estructura de los aluminosilicatos	20
1.2.4.2 Mecanismo de acción de los aluminosilicatos	20
1.3 Justificación	22
1.4 Objetivos	23
1.4.1 General	23
1.4.2 Particulares	23

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I

1.5 Hipótesis	24
2. Material y Métodos	26
2.1 Producción de las micotoxinas	26
2.2 Evaluación de los secuestrantes de micotoxinas	27
2.2.1 Análisis químico elemental	27
2.2.2 Desafíos de secuestro <i>in vitro</i>	28
2.2.2.1 Experimento 1	28
2.2.2.2 Experimento 2	31
2.3 Evaluación <i>in vivo</i>	33
2.4 Análisis estadístico	39
3. Resultados	40
4. Discusión	50
5. Conclusiones	70
6. Literatura citada	71
ANEXO 1. Tablas de resultados	85
ANEXO 2 Figuras	98

RESUMEN

EVALUACIÓN DE SECUESTRANTES DE MICOTOXINAS PARA REDUCIR LA TOXICIDAD EN DIETAS PARA POLLO DE ENGORDA CONTAMINADAS CON CULTIVOS DE *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium tricinctum* PRODUCTORES DE OCRATOXINA A Y TOXINA T-2

Para evaluar la eficacia de diferentes secuestrantes de ocratoxina A (OA) y toxina T-2 (T-2), se realizaron 2 experimentos *in vitro* y una prueba biológica. En el experimento 1 se utilizaron 9 aluminosilicatos y 1 producto de paredes celulares de levaduras (Mycosorb). Se probó la capacidad de secuestro de 2 µg de OA mediante la medición de micotoxina no adsorbida por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), y utilizando 3 métodos de extracción de OA. Se encontró una amplia variabilidad en los resultados según el método de extracción. Zeotek fue el producto cuya capacidad de secuestro se mantuvo constante en los tres ensayos (promedio superior a 80 % de secuestro). Los mismos secuestrantes se probaron con 250 mg de trigo contaminado con OA, encontrándose gran variabilidad debida a la heterogénea distribución de OA en el grano. Se midió el contenido de aluminio, silicio, sodio, potasio y calcio de los aluminosilicatos. El silicio fue el elemento más abundante (de 20.87 a 37.76 %), mientras el contenido de calcio fue para algunos productos el elemento en menor cantidad (de 0.02 a 0.56 %). Se midió también el pH de los secuestrantes, y se encontró que los aluminosilicatos tuvieron pH alcalino (de 8 a 9.6) y sólo Mycosorb tuvo pH ácido (5.6).

En el experimento 2 se probaron 3 secuestrantes: Zeotek, Mycofix y Celtic con 4 ppm de OA y 20 ppm de T-2, obtenidas de extractos crudos de grano contaminado, y se cuantificó la micotoxina no secuestrada mediante una prueba de ELISA. Zeotek tuvo la mayor capacidad de secuestro *in vitro* de OA (100 %) y de T-2 (8.67 %) aunque para ésta última, el resultado no fue satisfactorio en ninguno de los casos. No obstante, dado que éstos productos son ampliamente recomendados para el secuestro de OA y T-2, se seleccionaron para la prueba biológica, en la cual se utilizaron 288 pollos de engorda Ross de 1 día de edad. Las aves fueron alimentadas durante 21 días con las dietas experimentales con

base sorgo-soya. Los tratamientos incluyeron: testigo negativo, alimento con Zeotek y Mycofix, testigo de OA (567 ppb), T-2 (927 ppb) y ambas combinadas, así como las combinaciones de secuestrantes con OA, T-2 y ambas, a las concentraciones ya mencionadas. Adicionalmente se utilizó el producto Celtic, con OA y T-2 por separado. A los 21 días, se seleccionaron 5 aves por tratamiento, y se obtuvieron muestras de sangre para pruebas de bioquímica; las aves se sacrificaron y se obtuvieron los pesos relativos de hígado, riñón y bolsa de Fabricio. En la histología, se evaluaron: hígado, riñón, proventrículo y bolsa de Fabricio.

Se encontró que las aves alimentadas con dietas contaminadas con OA mostraron reducción del peso corporal y consumo de alimento, sin que se observase protección por algún secuestrante, pero en las aves que recibieron T-2, aunque se observó reducción significativa del peso y el consumo de alimento, se observó la reducción parcial de dichos efectos en las aves que recibieron Mycofix y Celtic. Las aves alimentadas con ambas micotoxinas mostraron efectos más severos. En la bioquímica sanguínea se observó reducción significativa de las PT, ALB y GL en aves tratadas con OA y T-2, con o sin secuestrante. AU se encontró elevado en aves que recibieron OA.

Las lesiones histológicas observadas en aves tratadas con OA fueron: necrosis del epitelio tubular renal, tumefacción de los hepatocitos, hiperplasia de conductos biliares y aumento del diámetro de las glándulas proventriculares. En aves tratadas con T-2 sólo se observaron lesiones en hígado, con las lesiones mencionadas, y bolsa de Fabricio, con depleción linfóide.

Estos resultados permiten concluir que: el desafío de secuestro *in vitro* no es una prueba confiable para la evaluación de un secuestrante de micotoxinas. Los efectos tóxicos de OA no pudieron ser contrarrestados por alguno de los secuestrantes estudiados, pero los efectos tóxicos de T-2 pudieron ser parcialmente contrarrestados por dos secuestrantes, bajo las condiciones de éste estudio.

SUMMARY

EVALUATION OF MYCOTOXIN BINDERS TO REDUCE TOXICITY OF BROILER DIETS CONTAMINATED WITH *Aspergillus ochraceus* AND *Fusarium tricinctum* PRODUCERS OF OCHRATOXIN A AND T-2 TOXIN

In order to assess ochratoxin A (OA) and T-2 toxin (T-2) binding ability of different sorbents, two *in vitro* experiments and a biological trial were performed. In experiment 1, nine aluminosilicates and a yeast derived product were evaluated for their ability to bind 2 µg of OA, by measuring free mycotoxin with high performance liquid chromatography (HPLC). 3 methods of OA extraction were employed, and a broad variability in results depending on the OA extraction method was found. Only a product showed a constant binding ability in the three assessed methods. Additionally, the same sorbents were tested with 250 mg of OA contaminated wheat, and even a broad variability in results was observed, likely due to an heterogeneous distribution of OA in grains, which may occur under natural conditions.

The contents of aluminum, silicon, sodium, potassium and calcium in the same aluminosilicates, were determined. Silicon was found to be the main compound (from 20.87 to 37.76 %) whereas calcium content for some aluminosilicates was scarcely detected (from 0.02 to 0.56 %). pH was also measured, and most of aluminosilicates were found to have an alkaline pH value (from 8 to 9.6) and only the yeast derived product had an acid pH value

In experiment 2, three sorbents named Zeotek, Mycofix and Celtic were challenged to 4 ppm OA and 20 ppm of T-2, separately. The mycotoxins were extracted from contaminated grain. Free mycotoxin was quantified by using a test of ELISA. Zeotek showed the highest OA binding (about 100 %) as well as T-2 toxin binding (8.67 %). For T-2 toxin, no satisfactory binding ability was found for any sorbent. In spite of this, the three sorbents tested in experiment 2 were chosen for *in vivo* trial. Two hundred eighty Ross x Ross one-day-old chickens were employed for the *in vivo* test. A totally randomized design in a 3 x 2 x 2 factorial arrangement was used for this experiment. The factors were: sorbents (no sorbent, Zeotek, Mycofix), OA (0 and 567 ppb) and T-2 (0 and 927 ppb). Treatments included 4 replicates of 5

chickens each. Additionally, Celtic was included in a treatment with OA and another with T-2 at the same doses of mycotoxins. OA and T-2 contaminated wheat and corn, respectively were added to sorghum-soybean meal diets to meet required mycotoxins doses according to each treatment. After 21 days, 5 chickens per treatment were randomly selected for blood chemistry determinations and gross and histological evaluations. Relative weights of liver, kidney and bursa of Fabricius were obtained. The same organs as well as proventriculus were taken for histological evaluation.

Results showed that chickens fed OA with and without sorbents had body weight and feed intake reduction. However, those birds fed T-2 were partly protected by two sorbents, although a significant difference was seen between birds which received no toxin and those fed diets with T-2 and sorbents. Birds fed both toxins showed more severe effects, and no protection of any sorbent was observed. These effects were additive. A significant reduction in plasma proteins, albumin and globulins was a characteristic observed in all birds fed diets with OA, T-2 and both, with or without sorbents. Uric acid level in blood was increased in all chickens fed OA contaminated diets. Histological findings observed in birds fed OA contaminated diets were: necrosis of kidney tubular cells, swollen and necrotic hepatocytes, bile ducts hyperplasia and increased diameter of proventriculous glands. In birds which received T-2 alone, only liver, with the same kind of lesions, and bursa of Fabricius, with lymphoid cells depletion, were affected.

According to these results, it can be concluded that *in vitro* binding assay is not a reliable test for evaluating mycotoxin sorbents. OA toxic effects could not be counteracted by any sorbent. However, birds fed T-2 contaminated diets were partially protected from toxicity by two sorbents used in this research.

1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producto del desarrollo de hongos en el grano y otras materias primas destinadas a la alimentación^{1 2 3}. Existe una amplia gama de éstos metabolitos, la mayoría no identificados¹. Su presencia en las materias primas y alimentos produce efectos fisiológicos detrimentales en los animales, siendo las aves especies susceptibles. Efectos como disminución de la ganancia de peso, inmunodepresión y mala pigmentación, traen como consecuencias pérdidas económicas para los avicultores por causa de las micotoxinas^{1 2 3 4}. Debido a éstos efectos se han ideado diferentes mecanismos para contrarrestar los efectos de las micotoxinas, entre los que destacan los tratamientos físicos y químicos,^{5 6} que pueden resultar difíciles de aplicar en gran escala. Por tal razón, la industria de los alimentos para animales ha recurrido al uso de secuestrantes de micotoxinas, entre los que se encuentran los aluminosilicatos. Estas moléculas poseen arreglos tridimensionales de alta porosidad y superficie de contacto, y se componen de aluminio, silicio y otros minerales. Los aluminosilicatos se adicionan al alimento y fijan las micotoxinas cuando éstas se encuentran en un medio acuoso^{7 8 9 10}. La efectividad de los secuestrantes ha sido comprobada para las aflatoxinas, toxinas producidas por *Aspergillus flavus*, en experimentos *in vitro* e *in vivo*^{11, 12}. Sin embargo, en los alimentos es factible encontrar otras micotoxinas de importancia clínica y económica e igualmente tóxicas para las aves, como la ocratoxina A (OA) y la toxina T-2 (T-2), que son dos de las micotoxinas más tóxicas para el pollo de engorda, y para las cuales no se ha demostrado que algún secuestrante sea capaz de reducir su toxicidad^{3, 13, 14 15}. Recientemente, nuevos

secuestrantes han surgido en el mercado para contrarrestar los efectos deletéreos de OA y T-2, entre otras micotoxinas. Sin embargo, la evaluación de los secuestrantes de micotoxinas se efectúa en la mayoría de los casos sólo por experimentos *in vitro*, que intentan simular las condiciones naturales de secuestro, sin conseguirlo. La evaluación de un secuestrante, según Dale ¹⁶ debería incluir experimentos *in vitro*, e *in vivo* con evaluación de lesiones macroscópicas e histológicas, además de bioquímica sanguínea; dado que los aluminosilicatos son básicamente arcillas obtenidas de minas pueden ser tóxicos *per sé* ¹⁷. Por otra parte, las micotoxinas difícilmente se encuentran solas en un ingrediente, debido a la presencia de diferentes hongos toxigénicos, los cuales son ubicuos y ampliamente distribuidos, o bien, un mismo hongo es capaz de producir diversos metabolitos tóxicos ⁴. Aunado a esto, y como resultado del desarrollo micótico, en los ingredientes se encuentran otros metabolitos fungales que no están identificados y que pueden ser tóxicos en menor proporción, pero que por sinergismo o aditividad, incrementan la toxicidad de la micotoxina que se encuentra en el alimento en mayor proporción y que puede ser identificada en el laboratorio. En diferentes estudios se han comparado los efectos tóxicos de la adición de grano inoculado con un hongo toxigénico y la adición de micotoxina pura, encontrándose diferencias en cuanto a mortalidad y lesiones más ampliamente diseminadas ^{18, 19}. La producción de micotoxinas en grano dentro de un laboratorio, y la contaminación del alimento con ése grano se asemeja más a lo que se puede encontrar a nivel de campo, donde los ingredientes se contaminan naturalmente por hongos productores de diferentes micotoxinas además de diversos metabolitos no

identificados. Por otro lado, gran parte de la funcionalidad y efectividad de los secuestrantes a nivel de campo dependerá del tipo de micotoxina, cuantas de ellas se encuentran en un alimento, y a la presencia de otros componentes derivados del metabolismo fúngico ^{4, 16 18 19}. Es importante, por lo tanto, la evaluación de un secuestrante tratando de simular una situación en el campo ^{16 20}.

Con éste contexto, el propósito de éste trabajo es obtener más información sobre la metodología de evaluación de los secuestrantes de micotoxinas además de evaluar aquellos que en México son recomendados para el secuestro de OA y T-2.

1.1 MARCO CONTEXTUAL

1.1.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA AVÍCOLA Y LAS MICOTOXINAS EN MÉXICO

La industria avícola ocupa un papel estratégico en la alimentación de la población en México. De acuerdo con datos de la UNA, el 60.23 % de los mexicanos incluyen en su dieta productos avícolas. En el año 2000 se produjeron 3.8 millones de toneladas de productos avícolas. La parvada nacional incluye más de 100 millones de gallinas ponedoras y 202 millones de pollos al ciclo ²¹. Igualmente, la avicultura es la principal industria transformadora de proteína de origen vegetal a animal: en la actualidad se consumen 11.1 millones de toneladas de alimento balanceado, de las cuales 7 millones de toneladas son granos forrajeros ²².

Los estudios sobre micotoxinas iniciaron después del descubrimiento de las aflatoxinas en 1960 ¹. Las pérdidas económicas por micotoxinas no han sido establecidas con certeza, pero se ha estimado que, en Estados Unidos, el 2 % del grano cultivado está contaminado con micotoxinas, y a nivel mundial, se calcula que cerca del 25 % de los cultivos están contaminados con micotoxinas ¹⁷. En México se han realizado pocos estudios para evaluar la epidemiología de las micotoxinas en los alimentos balanceados para animales. En 1991, Medina ²³ notificó que de 48 muestras de sorgo y alimento terminado analizado, el 12.5 y 25 % respectivamente, se encontraron contaminados con más de 1000 ppb de deoxinivalenol (DON) y sólo 0.9 y 10 % respectivamente se encontraron con más de 1000 ppb de zearalenona. De acuerdo con datos publicados por Medina ²⁴, en las muestras de sorgo analizadas por su

laboratorio durante 1994, el 14.8 % estuvieron contaminadas con OA entre 5 y 360 ppb En 1997, se encontraron 436 muestras de sorgo contaminadas con OA con valores de 1 a 15 ppb ²⁴.

1.2 MARCO TEÓRICO

1 2.1 MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos que no son utilizados por el hongo para desarrollarse ^{1 2 3}. Se ha comprobado su actividad como insecticidas y como antibióticos, por lo que se ha considerado que su función en el ciclo biológico del hongo es como un mecanismo de defensa y de competencia por un medio ¹. Existen más de 400 micotoxinas diferentes ^{11 25}, siendo desconocidos los efectos de la mayoría de ellas. Sin embargo, es ampliamente conocido que muchos de éstos metabolitos ejercen diversos efectos indeseables sobre la producción en diversas especies domésticas, entre las que se encuentran las aves ⁴. Su presencia en el alimento tiene como consecuencias pérdidas en la producción por disminución del crecimiento o de la producción de huevo ²³, inmunodepresión y mortalidad, ^{2 3 26} además de tener efectos negativos sobre la fertilidad en gallinas ²⁷ y alterar la deposición de pigmentos ocasionando pérdidas económicas para los productores en zonas donde la pigmentación tiene un valor comercial ²⁸

La mayor parte de lo que se conoce de las micotoxinas se ha estudiado a partir de 1960, con el descubrimiento de la enfermedad X del pavo, donde se estableció que las aflatoxinas habían causado el problema ²⁹. Enfermedades renales de origen desconocido fueron subsecuentemente atribuidas a OA en países escandinavos, donde demostraron que OA causaba nefropatía en cerdos ³⁰. Elling *et al.* ³¹ señalaron que OA producía nefropatía en aves (1975). En Estados Unidos y Canadá se han

señalado casos de mortalidad en pollos y pavos, con concentraciones de OA en los alimentos desde 0.3 hasta 16 mg/kg ³².

Dos de las micotoxinas de mayor importancia actual para la industria avícola, dada su toxicidad comprobada en aves ^{2 3} se consideran las siguientes:

1.2.2 OCRATOXINAS

1.2.2.1 Definición y estructura

Son un grupo compuesto por 7 metabolitos tóxicos cuya estructura química está compuesta por isocumarina ligada al aminoácido L-β-fenilalanina ^{1 2 3 30}. Fueron primeramente asociadas a *Aspergillus ochraceus*, de donde proviene su nombre, aunque pueden ser producidas por diferentes especies de *Aspergillus* y de *Penicillium* ^{1 30 33}. De los 7 metabolitos tóxicos identificados, la ocratoxina A (OA) es la más frecuentemente encontrada como contaminante de los alimentos, además de ser la más tóxica para las aves ^{2 3}, sobre todo para pollos en crecimiento ^{33 34 35}.

1.2.2.2 EPIDEMIOLOGIA

Las cepas toxígenas de *A. ochraceus* han sido aisladas de diferentes ingredientes: cacahuate, sorgo, pimienta roja, frijoles, arroz, maíz, soya, café y pan ^{2 3} ³³. *Penicillium viridicatum* ha sido aislado de trigo, frijol, cacahuate, alimentos peletizados, maíz y cebada ³³. En zonas geográficas de clima frío, se han aislado hongos del género *Penicillium* productores de OA, mientras que en zonas de clima templado, la producción ocurre por especies del género *Aspergillus* ³⁰. Se ha demostrado que la ocratoxina B, citrinina y ácido penicílico son producidos por los

hongos productores de OA ^{19 33 36}. Las concentraciones de OA obtenidas del análisis de diferentes materias primas van desde 5 ppb hasta 70 ppm ³⁷.

1.2.2.3 CARACTERÍSTICAS DE *Aspergillus ochraceus*

Es un hongo contaminante común de varios ingredientes alimenticios, y más común en regiones tropicales y subtropicales que *Penicillium*. Los organismos forman colonias de rápido crecimiento, de color amarillento-café. Los conidióforos no son ramificados, aseptados, y tienen una vesícula en la punta del conidióforo de donde se producen las esporas, y con un ápice hinchado. Las colonias en medio extracto de malta agar se forman más rápido que en el medio Czapek. Es usualmente cultivado a 25 C ^{38 39}.

La cantidad de OA producida por alguna especie dada es influenciada por varios factores, entre ellos la actividad de agua (Aw), cuyo valor ha sido encontrado en rangos de 0.83 a 0.9 para una óptima producción de OA, el tipo de sustrato y la temperatura ³⁰.

1.2.2.4 TOXICOCINETICA DE OA

OA es altamente soluble en solventes orgánicos y solo ligeramente soluble en agua, por lo que su absorción a nivel de membrana ocurre fácilmente ². OA se deposita en los tejidos suaves, encontrándose las concentraciones más altas en riñón y en menor cantidad en hígado. Se ha mencionado una baja distribución de OA en el músculo ³. La principal reacción de biotransformación es la hidrólisis a O α y L-fenilalanina. Un pequeño porcentaje es convertido a 4-hidroxi-ocratoxina A. La eliminación ocurre principalmente por vía urinaria, y en menor proporción por vía fecal

La vida media de la OA es de 4 h, y sus residuos desaparecen después de retirar el alimento en un tiempo de 4 h o menos. Se deposita en el huevo y le reduce la incubabilidad ^{2 3 40}. En aves, después de diferentes periodos de administración y a diferentes dosis, se han encontrado residuos en hígado y en músculos ⁴¹ Micco *et al.* ⁴⁰ alimentaron pollos de engorda y gallinas de postura con 50 ppb de OA durante 64 y 169 días, respectivamente, encontrando residuos de hasta 11 ppb de OA en hígado , y 0.8 ppb en el músculo de la pierna de las gallinas ⁴⁰.

1.2.2.5 MECANISMO DE ACCION

OA tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima fenilalanina-RNAt sintetasa, la cual participa en el paso inicial de la síntesis de proteínas ³⁰. A nivel de riñón, la OA reduce la codificación del RNAm para la síntesis de fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK), enzima que cataliza la descarboxilación del oxalacetato a fosfoenolpiruvato. Dicha enzima representa un eslabón entre el ciclo de transformación del ácido cítrico y la gluconeogénesis, la cual es la principal actividad metabólica generadora de carbohidratos que se realiza en la corteza renal ^{3 30}. Se ha demostrado que OA afecta la movilización del glicógeno hepático, lo cual ha sido atribuido a un malfuncionamiento del sistema de fosforilasas de la glucogenolisis ⁴². En condiciones normales, el glucógeno es degradado por la enzima glucógeno fosforilasa después de la activación de la fosforilocinasa, que a su vez es activada por AMPc dependiente de la proteína cinasa ^{42 43}.

1.2.2.6 SIGNOLOGIA CLÍNICA

Los pollos intoxicados sufren de emaciación, diarrea, pobre crecimiento e incremento de la mortalidad. OA causa un incremento en la ingesta energética y producción de calor ^{2 3}.

Los valores de la DL 50 para pollitos de 1 día varían desde 2.14 hasta 3.9 mg/kg ^{3 30}. Se han señalado también efectos adversos en el sistema inmune. Chang *et al* ⁴⁴ utilizaron OA cristalina y purificada en concentraciones desde 0.5 ppm, observándose una reducción significativa en las cuentas de leucocitos y linfocitos circulantes cuando se utilizaron concentraciones de 0.5 ppm. El número de monocitos se encontró reducido cuando se utilizaron 2 ppm de OA ⁴⁴. En otro estudio, los mismos investigadores observaron alteraciones en la actividad fagocítica y locomotora de los heterófilos cuando se utilizaron concentraciones de 4 y 8 ppm ⁴⁵. Singh *et al* ⁴⁶ encontraron una reducción de la inmunidad mediada por células medida por pruebas de sensibilidad cutánea y cuentas de linfocitos T, cuando se utilizaron concentraciones desde 0.5 a 2 ppm en la dieta. En el mismo estudio, el número de células encontradas en timo, bolsa de Fabricio y bazo, se encontró reducido ⁴⁶.

1.2.2.7 LESIONES MACROSCÓPICAS

Se ha observado deshidratación, emaciación, erosiones en la molleja, hemorragias proventriculares y enteritis catarral ². Los riñones se observan pálidos y aumentados de tamaño. El hígado puede estar aumentado de tamaño, pálido, friable y hemorrágico ^{2 3}. Puede ocurrir la acumulación de uratos en el parénquima renal y en membranas serosas, y se ha mencionado también una reducción en la fuerza

requerida para la ruptura de los huesos tibiotarsales, así como un adelgazamiento de la pared intestinal³. Con diferentes dosis de OA se ha observado aumento de tamaño de riñón, proventrículo, molleja e hígado, mientras que la bolsa de Fabricio se encuentra reducida de tamaño^{2 3 34 47}.

1.2.2.8 LESIONES MICROSCÓPICAS

Se han observado principalmente en riñón e hígado. En aves que consumieron entre 2 y 4 ppm de OA por 20 días, se observó dilatación severa de los túbulos contorneados proximales, así como engrosamiento de la membrana basal del glomérulo. Una concentración superior a 4 ppm en la dieta produjo incremento en los depósitos de glucógeno en los hepatocitos. En hueso se han observado lesiones como osteopenia generalizada y alteración de la osificación tanto endocondral como intramembranosa^{2 3 34 47}.

1.2.2.9 PATOLOGÍA CLÍNICA

En aves tratadas con 2 ppm de OA durante 21 días, se ha informado de la reducción en las concentraciones de hemoglobina, sin reducción en el número de eritrocitos circulantes, aunque si en el número de las células blancas circulantes. También se presenta un incremento de la glucosa circulante y reducción de la actividad de las enzimas hexocinasa y aldolasa. Otras enzimas séricas como la fosfatasa alcalina, gama glutamil transferasa, aspartato amino transferasa (AST) y otros parámetros como ácido úrico y creatinina se encuentran elevados, en tanto que las concentraciones de proteínas séricas, albúmina, fósforo, potasio y colesterol se ven reducidos^{2 3 15 48 49}.

1.2.3 TRICOTECENOS

1.2.3 1 Definición y estructura

Los tricotecenos comprenden un vasto grupo de más de 100 metabolitos fungales ^{2 3} producidos por diferentes especies de hongos del género *Fusarium* spp, además de los géneros *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cylindrocarpon* y *Phomopsis* ^{2, 3}. La estructura química descrita en general para éste grupo de micotoxinas es un núcleo tetracíclico sesquiterpénico con un anillo epóxido característico ^{2 3 50} el cual les confiere una alta estabilidad y resistencia a los tiempos prolongados de almacenaje y temperaturas de cocción ^{2, 50}. Todos los tricotecenos que se presentan en la naturaleza contienen un enlace olefínico en el carbono 9 y 10, y un grupo epóxido en C-12 y C-13, y usualmente un hidroxilo o grupo éster en C-3, C-7, C-8 y C-15 ⁵⁰. Ueno ⁵¹ designó a los tricotecenos en cuatro grupos: A, B, C y D. Los del grupo A exhiben una fluorescencia después de ser separados por cromatografía de capa fina y tratados por aspersion con ácido sulfúrico. Este grupo incluye T-2, neosolaniol, HT-2, y diacetoxiscirpenol (DAS). Los del grupo B exhibieron una mancha café mediante el mismo proceso, e incluyeron a nivalenol, fusarenon-X, deoxinivalenol (DON) y diacetil nivalenol. Químicamente, la diferencia entre ambos se encuentra en el carbono 8, en donde los del tipo B tienen un grupo cetona, y los del tipo A carecen de éste grupo, teniendo en su lugar un grupo H y un éster u OH ⁵⁰. Los tricotecenos del grupo C contienen un anillo epóxido en las posiciones C7 y C-8, e incluyen el componente denominado crotocina, producido por el hongo *Cephalosporium crotocinigeum*. Los del tipo D incluyen los derivados

macrocíclicos de verrucarinas y verrucarol. Estos tricotecenos tienen un anillo macrocíclico en la posición C-4 y C-15⁵⁰. Otros autores los dividen de inicio en macrocíclicos, cuya toxicidad no ha sido estudiada en aves, que incluye verrucarina y verrucarol, y los no macrocíclicos, comúnmente encontrados como contaminantes de los alimentos, y que incluyen a todos aquellos tricotecenos de importancia para las aves, y a su vez se subdivide a los tricotecenos del grupo A, que incluyen a la toxina T-2, HT-2 y diacetoxiscirpenol (DAS). La fusarenona X, deoxinivalenol (DON) y nivalenol pertenecen al grupo B^{2 3}.

1.2.3.2 EPIDEMIOLOGÍA

T-2 es la micotoxina más conocida de los tricotecenos, y es de amplia distribución en regiones de clima templado⁵⁰. Su presentación en climas tropicales y subtropicales no ha sido un problema, dado que en éstas regiones se han aislado otras especies del género *Fusarium* (*F. equiseti*, *F. solani* y *F. moliniforme*). De todas las especies productoras de T-2, *Fusarium tricinctum* ha sido la más frecuentemente aislada⁵⁰. La contaminación ocurre en diferentes granos tales como maíz, trigo, cebada, avena, arroz, sorgo, y en alimentos terminados, y se ha informado a nivel mundial, siendo más frecuente en aquellas regiones geográficas con climas húmedos¹. El desarrollo fungal se ha encontrado favorecido por alta humedad y temperatura desde 6 hasta 24° C^{1 2, 3, 50}. La intoxicación natural en el humano y animales domésticos como gallinas, pavos, bovinos, equinos y cerdos causada por el consumo de alimentos contaminados con *Fusarium* spp se ha descrito en diferentes países como Japón, Corea, Estados Unidos y Rusia. Una de las intoxicaciones conocidas es

la aleukia tóxica ocurrida en Rusia en 1944, la cual causó la muerte a miles de personas^{50 52}.

1.2.3.3 CARACTERÍSTICAS DE *Fusarium tricinctum*

Cuando se cultiva en medio Czapek, *F. tricinctum* llega a producir colonias de color blanco, rojo o carmín. Su micelio aéreo es abundante, algodonoso y flocooso. Las microconidias son más abundantes que las macroconidias, formadas en fiálides cilíndricas de conidióforos ramificados. El hongo se ha cultivado en rangos de temperatura de 6 a 25 C. Ueno⁵³ obtuvo 331 mg/l de T-2 al cultivar al hongo a 27 C por 2 semanas. Lillehoj⁵⁴ produjo la mayor concentración de T-2 (9.9 g/1.2 kg) después de 3 semanas cuando cultivó el hongo a 15 C, en comparación con 20 y 25 C

54

1.2.3.4 BIOSÍNTESIS.

Poco se sabe con certeza acerca de la formación de los tricotecenos. Joffe⁵⁰ mencionó que se forman por la ciclización del farnesil pirofosfato, seguido por dos transferencias consecutivas del grupo 1-2 metil. Mediante estudios con isótopos radioactivos, se ha demostrado que el acetato de sodio y el ácido mevalónico son requeridos durante la biosíntesis de los tricotecenos. La biosíntesis de una u otra micotoxina por una misma especie de hongo se mencionado también ser dependiente del sustrato y la temperatura de incubación del hongo⁵⁰

1 2.3.5 TOXICOCINÉTICA

La cinética de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación ha sido estudiada por varios autores. Después de la administración oral se han encontrado concentraciones máximas en sangre después de 1 hora post administración. (4, 5). Las respuestas biológicas sugieren una rápida absorción desde las zonas expuestas, las cuales son principalmente piel y tracto gastrointestinal³. La piel y el tejido subcutáneo actúan aparentemente como reservorios. Estudios con toxina T-2 marcada radiactivamente muestran que dicha toxina se distribuye a hígado, riñón, estómago y bilis³. Las concentraciones más altas de toxina T-2 se han encontrado en los tejidos de órganos involucrados en su excreción, especialmente bilis, vesícula, hígado, riñón e intestino. La detoxificación ocurre en dos fases como la mayoría de los xenobióticos. En la fase I ocurren reacciones de deacilación (hidrólisis), hidroxilación (oxidación) y deepoxidación (reducción). La hidrólisis inicial produce metabolitos casi tan tóxicos como los originales (HT-2, MAS) por lo que no se consideran realmente una detoxificación. La hidrólisis posterior de T-2 produce los alcoholes tetraol y scirpentriol, menos tóxicos³. Las reacciones de oxidación han sido reportadas sólo para T-2. Se ha también indicado la reducción del anillo 12,13-epóxido por parte de la microflora intestinal, lo cual es una vía importante para la detoxificación de la toxina⁵⁵. De las reacciones de fase II sólo la conjugación glucurónica ocurre para la toxina T-2, DAS y DON. Estos compuestos conjugados son excretados mediante la bilis y pueden ser liberados nuevamente por la microflora a su paso por el tracto gastrointestinal y entonces ser reabsorbidos³.

En cuanto a los residuos, varios estudios han sido realizados para determinar la presencia de tricotecenos o sus metabolitos en diversos tejidos. En pollos alimentados con 4 ppm de DON durante 28 días, y gallinas que recibieron 5 ppm de DON durante 190 días, no tuvieron niveles detectables en huevos, músculo, hígado y molleja (22). En gallinas que recibieron 1 mg de T-2/kg de peso, durante 8 días consecutivos, la cantidad de toxina en huevo fue de 0.9 µg⁵⁶.

1.2.3.6 MECANISMO DE ACCIÓN

Los tricotecenos son potentes inhibidores de la síntesis de proteínas, incluso inhiben el desarrollo de otros organismos. La síntesis de proteínas puede ser inhibida en alguna de sus etapas. La enzima ribosomal peptidil transferasa, esencial en los pasos de elongación y terminación, es presumiblemente bloqueada por los tricotecenos^{3 50}. Las células más afectadas son aquellas en constante división celular, tales como las células de los órganos hematopoyéticos y linfoides, las células de las criptas intestinales y las células de la piel³. La toxina T-2 puede ser incorporada a los componentes lipídicos y proteicos de la membrana celular, dadas sus propiedades anfipáticas, y así interferir en las funciones normales de la célula. Otro de los mecanismos de acción es un incremento en la peroxidación de lípidos, que se considera ser producida por la depleción hepática de la enzima glutatión reducida (GSH)⁵⁷, dado que varios tricotecenos tienen la capacidad de inactivar los grupos SH contenidos en los centros activos de las enzimas^{3 50}.

Los tricotecenos son considerados como componentes altamente tóxicos. Las dosis letales (DL 50) para pollitos de 1 día de edad para el caso de toxina T-2 se

encuentran entre 4.97 y 5.25 mg/kg^{3 50}. El deoxinivalenol (DON o vomitoxina) es el compuesto menos tóxico, cuya DL 50 es de 140 mg/kg^{3 50}

La actividad inmunosupresora ha sido también estudiada⁵⁸. Necrosis y depleción linfoides se han encontrado en timo, bazo y bolsa de Fabricio. Los tricotecenos tienen un efecto negativo sobre los niveles de proteínas en el plasma, la producción de anticuerpos y la inmunidad mediada por células^{2 3 14 59}. Hoerr *et al*⁶⁰ administraron toxina T-2 (1.5-3 mg/kg) por sonda directamente en el buche durante 2 semanas. A la necropsia se observaron los órganos linfoides atróficos y microscópicamente se observó depleción de tejido linfoides y hematopoyético.

1.2.3.7 PATOLOGÍA MACROSCÓPICA

Según la dosis y el tipo y edad del ave, los tricotecenos producen lesiones erosivas y ulcerativas en la mucosa oral, caracterizadas por desarrollo de placas amarillo grisáceas, acumulación de exudado en paladar, lengua y piso de la cavidad oral y necrosis de la mucosa oral^{2 3 60}. En órganos linfoides y hematopoyéticos se observa necrosis y atrofia. Se observan también focos de necrosis hepática y hemorragia, con necrosis e inflamación de la vesícula biliar. La necrosis y la ulceración también ocurren en la mucosa del proventrículo, molleja, mucosa intestinal y el epitelio plumoso^{2,3 52, 60}. Se observan alteraciones en las plumas de las aves afectadas. Aves alimentadas con cultivos de *Fusarium* spp en maíz han mostrado diferentes lesiones de aquellas aves alimentadas con toxina T-2 pura. Hoerr *et al*¹⁸ observaron muy alta mortalidad (50 %) a los 17 días de iniciado el tratamiento; las lesiones microscópicas en las aves sobrevivientes consistieron en necrosis y atrofia de los órganos linfoides,

necrosis de la mucosa gastroentérica, epidermis y túbulo renales. Se observó también vacuolización de los hepatocitos, hiperplasia de conductos biliares, necrosis de la mucosa del buche y reducción de los folículos tiroideos. El grano contaminado contenía 5 ppm de toxina T-2, 0.5 ppm de neosolaniol y otros metabolitos no identificados ¹⁸.

1.2.3.8 LESIONES MICROSCÓPICAS

En la histopatología por la intoxicación aguda se encontró necrosis de los tejidos hematopoyético y linfóide, focos de necrosis de hepatocitos, necrosis e inflamación de la vesícula biliar, proliferación de los ductos biliares, necrosis del epitelio intestinal, reducción de las vellosidades, necrosis de la mucosa del proventrículo y molleja, además del epitelio plumoso ^{2 3 18 60}

1.2.3.9 PATOLOGÍA CLÍNICA

Durante intoxicación por T-2 a diferentes dosis se ha notado incremento en las concentraciones de las enzimas de la transformación del sistema glutatión (GSH) (GSH peroxidasa, GSH reductasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa). Cambios bioquímicos incluyen incremento en las enzimas aspartato amino transferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH), así como reducción del ácido úrico y fosfatasa alcalina ^{13. 14 48}

1.2.4 REDUCCIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS MICOTOXINAS

Debido a los efectos detrimentales que éstos agentes tóxicos tienen sobre los animales en producción, se han ideado diversos mecanismos para contrarrestar el desarrollo fungal en los granos y la consecuente formación de micotoxinas, tal como la adición de fungicidas a las dietas ⁴. Otros métodos, los más comunes, están encaminados a reducir la toxicidad de las micotoxinas una vez que éstas han sido formadas, entre los que se encuentran: inactivación térmica, separación física, amonización, inactivación con ozono, degradación microbiana ^{5 6}, y el uso de secuestrantes ^{7 11 12 13 61 62 63 64 65}. Desafortunadamente muchas de estas medidas son difíciles de aplicar, requieren tiempo para llevarse a cabo y son parcialmente efectivas. Las ventajas por el uso de secuestrantes, entre los que se encuentran carbón activado, diferentes arcillas y los aluminosilicatos, incluyen el precio, seguridad en el manejo, y fácil administración, puesto que se adicionan a las dietas ^{9 10 61}. Recientemente se ha hecho énfasis en el uso de los mananooligosacáridos de las paredes celulares de levaduras, como adsorbentes de aflatoxinas a una menor concentración en la dieta, y con una buena protección de la toxicidad ^{25 66}. Sin embargo no todos los secuestrantes son capaces de adsorber todas las micotoxinas que pueden estar en un alimento, aunado al hecho de que no siempre se encuentra un solo tipo de micotoxinas en el alimento contaminado ^{16 17}.

1.2.4.1 ESTRUCTURA DE LOS ALUMINOSILICATOS

Los aluminosilicatos son minerales de origen natural o sintético, con una estructura basada fundamentalmente en silicio y aluminio ^{7 9}. En la industria pecuaria se encuentran 2 tipos de aluminosilicatos: los filosilicatos y los tectosilicatos. Los primeros poseen una estructura plana bidimensional compuesta por capas u hojas de tetraedros unidos a capas de octaedros. El caolín y la montmorillonita, principal componente de la bentonita, pertenecen a éste grupo. El espacio entre las diferentes capas es donde se realiza la adsorción, y generalmente se encuentra ocupado por agua y cationes ^{7 9, 67}.

Los tectosilicatos son minerales de estructura tridimensional, compuestos por tetraedros de silicio o aluminio unidos unos con otros mediante sus cuatro oxígenos. Las zeolitas son los minerales de éste grupo que se utilizan como adsorbentes. Al igual que en el caso de los filosilicatos, los espacios entre las diferentes láminas así como los poros formados por las diferentes átomos de aluminio y silicio, son el sitio de adsorción. El tamaño del poro determinará el tamaño de partícula que pueda ser adsorbida ^{7 9}.

1.2.4.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ALUMINOSILICATOS

En la superficie de los aluminosilicatos existen interacciones diversas entre los iones. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) en los aluminosilicatos mide el área y la carga eléctrica superficial ^{7, 9 10 68}. La CIC es el número de cationes que pueden ser extraídos de la superficie del aluminosilicato y reemplazados por otros. De ésta manera, los cationes pueden salir del espacio interlaminar y dejar su lugar a los

cationes presentes en el medio. Este es el principio de la adsorción de las micotoxinas por parte del aluminosilicato, ya que si la molécula orgánica es polar o sus grupos funcionales se pueden intercambiar con los presentes en el aluminosilicato y podrá ocurrir la adsorción. Este fenómeno dependerá de la micotoxina, ya que por ejemplo, la aflatoxina es más polar que la zearalenona, lo cual explica el porqué *in vivo* ocurre la adsorción de la primera y no de la segunda ^{7 9}. En el caso de ocratoxina A y toxina T-2 hasta el momento no se conoce el mecanismo por el cual los aluminosilicatos pueden adsorber dichas micotoxinas ^{13 14 15}.

Numerosos trabajos han sido realizados para evaluar el efecto adsorbente de los aluminosilicatos sobre la aflatoxina B1, en los cuales se ha logrado la reducción de los efectos tóxicos por la adición de éste producto ^{11 12 61 62 63 64 69 70}. Sin embargo su eficacia no ha sido tal para el caso de la ocratoxina A y la toxina T-2 ^{13 14 15 59 66}.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se ha incrementado la venta comercial de secuestrantes de micotoxinas, por lo que se hace necesario obtener información del potencial real de éstos productos y que el avicultor tenga información que le permita tomar decisiones sobre su uso. De ésta manera los fabricantes de secuestrantes pueden acceder a metodologías específicas de control de calidad mediante una evaluación *in vitro* e *in vivo*, especialmente de aquellos productos de reciente lanzamiento al mercado, que señalan ser capaces de adsorber varias micotoxinas, y realmente no se conoce su comportamiento frente a metabolitos producidos por los hongos productores de OA y T-2, en condiciones naturales, ni frente a la combinación de éstas micotoxinas. La eficacia de los nuevos productos debe ser probada tanto en estudios *in vitro*, evaluando su capacidad de adsorción, como *in vivo*, mediante la evaluación de parámetros productivos, lesiones macroscópicas y microscópicas, además de parámetros de bioquímica clínica y hematología. Por esta razón, se realizó una investigación encaminada a evaluar el efecto protector a OA y T-2 de diferentes secuestrantes de micotoxinas ofrecidos en el mercado para la producción avícola

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 General:

Evaluar la eficacia de varios secuestrantes de micotoxinas para disminuir la toxicidad de la ocratoxina A y toxina T-2 mediante estudios *in vitro* e *in vivo* con pollo de engorda

1.4.2 Particulares:

Determinar la capacidad de adsorción *in vitro* de diferentes secuestrantes en contra de ocratoxina A y toxina T-2

Analizar la composición química elemental de los aluminosilicatos utilizados (sodio, calcio, potasio, aluminio y silicio) mediante espectroscopía de absorción atómica

Evaluar el comportamiento productivo de pollos de engorda después de 21 días de alimentación con dietas contaminadas con OA y T-2, adicionadas con 3 secuestrantes de micotoxinas

Identificar cambios patológicos macroscópicos en pollos de engorda de 21 días, incluyendo una evaluación visual de las lesiones orales resultado de la presencia de OA y T-2 en el alimento.

Obtener el peso relativo de hígado, riñón y bolsa de Fabricio, como indicadores de daño ocasionado por las micotoxinas.

Describir cambios histológicos en proventrículo, hígado, riñón y bolsa de Fabricio de las aves experimentales

Medir en plasma los siguientes componentes sanguíneos: aspartato amino transferasa (AST), proteínas totales, albúmina, globulinas y ácido úrico.

Medir calcio y fósforo en hueso de las aves experimentales

1.5 HIPÓTESIS

1. Existen en el mercado secuestrantes de micotoxinas con una adsorción *in vitro* de ocratoxina A y toxina T-2 superior al 70 %

2. La adición de un secuestrante en las concentraciones recomendadas por los fabricantes del producto (de 0.25 a 0.5 %) a una dieta de pollo de engorda contaminada con un cultivo de *A. ochraceus* y *F. tricinctum* productores de ocratoxina A y toxina T-2 respectivamente, protege a las aves de los efectos detrimentales de dichas toxinas, cuyo efecto es visible en cuanto a reducción de la ganancia de peso y mortalidad.

3. El peso corporal y consumo de alimento no son estadísticamente diferentes en las aves que consumen alimento contaminado con micotoxinas más secuestrante, respecto a las aves del grupo control.

4. Los secuestrantes reducen la presentación de lesiones orales por la presencia de toxina T-2. Asimismo, su adición en la dieta no produce diferencia en cuanto al peso relativo de hígado, bazo, bolsa de Fabricio y riñón.

5. Como resultado del uso de los secuestrantes en la dieta contaminada, no hay cambio significativo en las concentraciones de AST y ácido úrico en las aves tratadas con OA y T-2

6 No hay reducción en la concentración de proteínas plasmáticas totales, albúmina y globulinas por efecto de OA y T-2, lo que implica que los secuestrantes tendrán un efecto protector de los efectos de las micotoxinas.

7. No se observan lesiones microscópicas significativas en las aves tratadas con OA y T-2 más secuestrantes, lo que implica un efecto protector de tales productos.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 PRODUCCIÓN DE LAS MICOTOXINAS

Producción de OA: Se utilizó una cepa de *Aspergillus ochraceus*, la cual fue cultivada en el laboratorio de micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El procedimiento utilizado para la producción de ésta toxina se basó en metodologías previamente publicadas^{36 71}, y fue el siguiente:

Para cultivar el hongo se utilizó el medio agar Sabouraud de 72 a 96 h a temperatura ambiente. Como sustrato para que el hongo produjera la micotoxina se utilizaron 400 g de trigo en botellas de vidrio. El grano se cubrió con agua para aumentar el contenido de humedad. El agua fue retirada 30 minutos después de su aplicación con la finalidad de que el grano alcanzara un grado de humedad superior al 30 %, determinada mediante una estufa a 100° C durante 24 h. Las botellas fueron tapadas con algodón, y sometidas a esterilización en autoclave a 121 ° C, 15 lb de presión por 20 min. Para la inoculación de las botellas se utilizó solución salina fisiológica estéril con 0.5 % de Tween 80 para la colección de las esporas del hongo. Cada botella recibió, en condiciones de esterilidad, 5 ml de un inóculo conteniendo entre 5 y 8 x 10³ esporas/mm³. Las botellas con el grano inoculado fueron incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente (25-28 ° C), recibieron una agitación ligera diariamente después de 96 h para favorecer el desarrollo uniforme del hongo sobre la superficie del grano. Después de 3 semanas de incubación se tomó una muestra de grano contaminado en condiciones estériles. La muestra fue sometida a autoclave para matar al hongo, y posteriormente fue analizada por cromatografía de capa fina, siguiendo la metodología

desarrollada por Stolof *et al.*⁷², con el fin de determinar si había producción de OA. La cuantificación final de OA tanto en el cultivo como en el alimento se realizó mediante HPLC, de acuerdo con el método publicado por Nesheim *et al.*⁷³

Para la producción de toxina T-2 se utilizó una cepa de *Fusarium tricinctum* ATCC 1422, que fue cultivada en maíz, con base en estudios previos^{53 74 75}. Los procedimientos de inoculación y determinación de la presencia de la micotoxina fueron similares a los utilizados para OA. La incubación en éste caso se realizó entre 15 y 20° C. Un inóculo de 5 ml para cada botella contenía 1.4×10^4 esporas /mm³. Posteriormente, y una vez comprobada la presencia de OA y T-2 en los sustratos, el grano fue esterilizado por autoclave, molido y secado en una estufa a 55 ° C por 48 h para su posterior inclusión en el alimento. La semicuantificación y cuantificación de toxina T-2 tanto en los cultivos en grano como en el alimento terminado, se realizó por el método de ELISA, utilizando el kit comercial BIOPHARM®.

2.2 EVALUACIÓN DE LOS SECUESTRANTES DE MICOTOXINAS

2.2.1 ANÁLISIS QUÍMICO ELEMENTAL

Se midió el contenido de minerales de 9 aluminosilicatos, mediante espectroscopia de absorción atómica, previa digestión, basada en métodos reportados previamente^{69, 76}, y realizada mediante el siguiente procedimiento:

Digestión: se utilizó 1 g de aluminosilicato al cual se adicionaron 20 ml de ácido fluorhídrico. Esta digestión se mantuvo durante 2 h en baño María, a una temperatura de 75 C. Posteriormente se adicionaron 10 ml de ácido clorhídrico y se continuó la digestión durante 1 h más. Las muestras fueron filtradas y diluidas con agua

bidestilada hasta un volumen de 50 ml. La medición de calcio y aluminio se realizó mediante absorción atómica, utilizando la lámpara correspondiente y flama aire-acetileno para calcio, mientras que para aluminio se utilizó una flama acetileno-óxido nitroso. La medición de sodio, potasio y silicio se hizo por emisión atómica; se utilizó flama aire-acetileno para los dos primeros, y flama acetileno-óxido nitroso para silicio utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer® modelo AAnalyst 100⁷⁶.

Para vigilar el comportamiento del método de digestión, se sometió el aluminosilicato químicamente puro FLUKA® a los mismos procedimientos. Para los cálculos de concentración de los elementos medidos, se calculó la curva de regresión lineal utilizando los valores de absorbancia de estándares de concentración conocida, considerando peso de las muestras, diluciones realizadas y volúmenes de aforo.

2.2.2 DESAFÍOS DE SECUESTRO *in vitro*.

Para la evaluación de la capacidad de adsorción de los secuestrantes, se realizaron dos experimentos, los que a continuación se describen:

2.2.2.1 EXPERIMENTO 1.

Consistió en la evaluación de la capacidad de secuestro *in vitro* de OA por 10 secuestrantes de micotoxinas, 9 aluminosilicatos y un producto a base de paredes celulares de levaduras, mediante la medición de la OA no adsorbida (libre) por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Para ello, se utilizó un diseño de bloques al azar, en el que se consideraron 3 métodos de extracción de la micotoxina

libre como criterio de bloque, siendo la variable el porcentaje de adsorción de OA por parte de cada secuestrante.

Para tal fin, se trabajó con el siguiente protocolo: en un tubo de polipropileno (FALCON), se adicionaron 500 mg de secuestrante mas 20 ml de una solución de pepsina al 0.2 % (actividad 1:10,000) en ácido clorhídrico 0.075 N (Solución para determinación de digestibilidad de la proteína en pepsina, Método AOAC ⁷⁷ 971.09). Se realizó un ensayo con 250 mg de trigo contaminado con OA, como fuente de micotoxina para el desafío (Ensayo I) y por otro lado 2 µg de OA purificada (Ensayos II a IV). En cada uno de los ensayos, se utilizó un tubo con OA sin secuestrante como testigo para monitorear el comportamiento de la prueba.

Las mezclas fueron incubadas en baño María a 37 C durante 3 h en oscuridad y con agitación constante. Al término de éste tiempo, la solución de pepsina se pasó por papel filtro, y a partir de ella se extrajo la OA remanente (no adsorbida) siguiendo 3 diferentes metodologías: según la metodología recomendada por Stoloff *et al.* ⁷² (Ensayo II), la sugerida por Nesheim *et al.* ⁷³ para HPLC con y sin filtración de la muestra (Ensayo III y IV, respectivamente). Para todos los casos, las muestras fueron inyectadas a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con automuestreador y detector de fluorescencia Perkin Elmer®. utilizando las siguientes condiciones: longitud de onda de excitación: 333 nm; emisión: 460 nm; tasa de flujo: 1ml/min ⁷³. El cálculo de las áreas bajo la curva para cada cromatograma fue realizado por medio de un software especializado. Los cálculos de concentraciones fueron realizados mediante el cálculo de la curva de regresión lineal simple, en la que se graficó y

calculó el área de tres estándares de OA de concentración conocida, y se compararon éstos con las áreas de las muestras problema, considerando, además, peso de las muestras y volúmenes de dilución. Para el cálculo del porcentaje de adsorción se cuantificó la micotoxina presente en el testigo negativo (tubo sin secuestrante) y se consideró ésta como el cien por ciento de la micotoxina libre (cero por ciento de adsorción).

Los secuestrantes fueron suspendidos en agua bidestilada y mantenidos en agitación mediante un agitador magnético mientras se les determinó el pH con un potenciómetro

2.2.2.2 EXPERIMENTO 2

Consistió en estudiar la capacidad adsorbente de OA y T-2 de tres secuestrantes (Zeotek, Mycofix y Celtic). Para éstos desafíos se utilizó un arreglo factorial 2 x 4, siendo el primer factor las micotoxinas (OA y T-2), y el segundo fueron los secuestrantes (sin secuestrante, Zeotek, Mycofix y Celtic). El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{(ijk)}$$

En donde:

Y_{ijk} = valor observado en la k-ésima repetición de la (ij) -ésima combinación de tratamientos

μ = media general

α_i = efecto del i-ésimo nivel del factor α (micotoxinas) en donde $1 \leq i \leq 2$

β_j = efecto del j-ésimo nivel del factor β (secuestrantes) en donde $1 \leq j \leq 3$

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción de los factores α y β .

$\varepsilon_{(ijk)}$ = efecto del error experimental

Como fuente de micotoxina se utilizó un extracto crudo a partir de trigo y maíz contaminados con OA y T-2, respectivamente, de acuerdo con la metodología de Stolof *et al.*⁷², y ambos resuspendidos en metanol absoluto. Los extractos fueron cuantificados por ELISA antes del estudio. La metodología utilizada para éste ensayo fue la siguiente: OA fue resuspendida para obtener una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$, mientras que T-2 se utilizó a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Se pesaron 500 mg de secuestrante, colocándose en un tubo de polipropileno, al cual se agregaron 20 ml de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la solución de pepsina ácida (la misma que para el experimento 1) y 1 ml de los extractos correspondientes de micotoxina. Asimismo, en otros tubos se colocaron la solución de pepsina ácida y la micotoxina, sin secuestrante, la cual se utilizó como testigo. Se trabajaron 2 repeticiones por tratamiento, y se incubaron bajo las mismas condiciones mencionadas en el experimento 1. Al término de la incubación, las muestras fueron filtradas, y una alícuota de 5 ml fue tomada de cada tubo. El pH de las muestras fue ajustado a la neutralidad con KOH, y se realizó la extracción de la micotoxina remanente (no adsorbida) con metanol al 70 %. Ésta solución se diluyó 1:1, y se tomaron 50 μ l para realizar el procedimiento de ELISA, utilizando un kit comercial para la determinación de OA y T-2, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (BIOPHARM ®). Se utilizaron 3 estándares de OA y T-2, respectivamente. En todos los casos se midió la absorbancia producida por la reacción. Para el cálculo de la concentración de OA y T-2 remanente, se calculó la curva de regresión lineal simple utilizando la absorbancia de los estándares y su concentración (Figuras 4 y 5), y comparando los resultados de absorbancia de las muestras con OA y T-2.

2.3 EVALUACIÓN *in vivo*

Para la prueba biológica se utilizaron dos secuestrantes más ampliamente recomendados por los fabricantes y empleados en granjas avícolas con episodios de contaminación con OA y T-2. Se utilizó un arreglo factorial 3x2x2, siendo los secuestrantes el primer factor, con 3 niveles: 2 secuestrantes (Zeotek a 1.5 kg/ton y Mycofix a 2.5 kg/ton) y un nivel cero (sin secuestrante); el segundo factor fue la ocratoxina A, con 2 niveles: 0 ppb y 567 ppb en el alimento; el tercer factor fue la toxina T-2, con 2 niveles: 0 ppb y 927 ppb. El modelo estadístico utilizado para el experimento *in vivo* fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{(ijk)l}$$

En donde:

μ = media general

α_i = efecto del i-ésimo nivel del factor α (secuestrantes de micotoxinas) ($1 \leq i \leq 3$)

β_j = efecto del j-ésimo nivel del factor β (ocratoxina A) ($1 \leq j \leq 2$)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción de los factores α y β

γ_k = efecto del k-ésimo nivel del factor γ (toxina T-2) ($1 \leq k \leq 2$)

$\alpha\gamma_{ik}$ = efecto de la interacción de los factores α y γ

$\beta\gamma_{jk}$ = efecto de la interacción de los factores β y γ

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ = efecto de la interacción de los factores α , β y γ

$\varepsilon_{(ijk)l}$ = efecto del error experimental

Y_{ijkl} : matriz de los valores observados para cada variable

Se utilizaron trigo y maíz contaminados con OA y T-2, respectivamente, para la contaminación de las dietas que incluyeron éstas micotoxinas, en las cantidades necesarias para alcanzar la concentración mencionada de OA, T-2 y ambas. El grano fue previamente esterilizado, molido y secado, como se mencionó previamente. El alimento contaminado y sin contaminar se basó en dietas sorgo-soya dietas sorgo-soya para pollo de engorda en iniciación, con las concentraciones mencionadas de las micotoxinas. Las combinaciones de tratamientos fueron las siguientes:

T1: Testigo (aves alimentadas con dieta sin secuestrante ni micotoxina)

T2: Zeotek (Secuestrante 1)

T3: Mycofix (Secuestrante 2)

T4: 567 ppb de OA

T5: 927 ppb de T-2

T6: 567 ppb de OA mas 927 ppb de T-2

T7: Como T4 + Sec. 1

T8: Como T4 + Sec. 2

T9: Como T5 + Sec. 1

T10: Como T5 + Sec. 2

T11: Como T6 + Sec. 1

T12: Como T6 + Sec. 2

Adicionalmente, se probó el producto Celtic (Secuestrante 3) a una dosis de 3 kg/ton, incluido en dos tratamientos más: T13: Como T4 + Sec. 3; T14: como T5 + Sec. 3

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en Tláhuac, Distrito Federal.

Se utilizaron 288 aves Ross x Ross de 1 día de edad, alojadas en baterías de crianza con bebederos y comederos individuales, y calefacción eléctrica. Cada tratamiento contó con 4 réplicas de 6 aves, que fueron asignadas aleatoriamente. Las aves fueron alimentadas durante 21 días con dietas a base sorgo-soya, y los niveles de micotoxina y secuestrantes mencionados anteriormente. A los 12 días de edad las aves se vacunaron contra enfermedad de Newcastle por vía ocular y por vía subcutánea. Semanalmente se llevó un registro de ganancia de peso, alimento consumido y mortalidad. A los 21 días de edad se seleccionaron aleatoriamente 5 aves por tratamiento. A partir de éstas aves se realizaron las siguientes pruebas:

BIOQUÍMICA SANGUÍNEA: En la sangre de cada ave, obtenida por punción cardiaca y tratada con heparina, se realizó la medición de proteínas plasmáticas totales, albúmina y globulinas como indicadores de integridad hepatocelular, la enzima plasmática aspartato amino transferasa (AST) como indicador de función hepática, y ácido úrico para funcionamiento renal.

PATOLOGÍA MACROSCÓPICA: Se evaluaron hallazgos macroscópicos en boca, lengua, esófago, hígado, riñón, bolsa de Fabricio (BF), proventrículo (PV) y molleja (MLL) en 5 aves por tratamiento. Cada ave fue pesada e identificada, y el hígado, riñón izquierdo y bolsa de Fabricio fueron pesados individualmente. Se midieron los

diámetros de la molleja y el proventrículo por su eje mayor, además de la unión proventrículo-molleja

HISTOPATOLOGÍA Se obtuvieron muestras de riñón, hígado, proventrículo, bolsa de Fabricio, de cada ave, y fueron fijadas con formalina al 10 %.: La evaluación microscópica se realizó de la siguiente manera:

Se obtuvieron cortes de riñón, teñidos por la técnica de hematoxilina-eosina, de las 5 aves por tratamiento, en los cuales se contaron las células tubulares íntegras y en necrosis presentes en 5 túbulos renales observados aleatoriamente. Se evaluaron aleatoriamente 10 campos por corte, observados con el objetivo 40x. Con ésta información se obtuvo un porcentaje de células en necrosis, tomando como total a las células contadas en un campo.

Por otra parte, en 25 glomérulos por corte se midieron 2 diámetros glomerulares: un diámetro mayor, obtenido de un extremo a otro de la membrana glomerular perpendicular a la entrada del vaso sanguíneo, y un diámetro menor, obtenido de un extremo a otro del ovillo. Con ésta información, se obtuvo el porcentaje del glomérulo ocupado por el ovillo, con el fin de determinar un engrosamiento de la membrana glomerular.

En proventrículo se evaluaron 5 cortes por tratamiento; en cada corte se seleccionaron 5 glándulas adyacentes a la capa muscular del órgano, con presencia de conducto. Se midió el diámetro transversal de la glándula, y el diámetro de su conducto, utilizando el objetivo panorámico, con el fin de evaluar la dilatación de las glándulas proventriculares; además se midió el grosor del epitelio de recubrimiento del conducto

glandular, utilizando el objetivo 40x, para determinar hiperplasia. Finalmente, se contaron los acúmulos de tejido linfoide presentes dentro de dichas glándulas.

En hígado, se determinó un porcentaje de células tumefactas, células en necrosis y tejido de reparación, por campo. Aleatoriamente, se evaluaron 10 campos por corte, y se contó el número de conductos biliares en 6 espacios porta

En bolsa de Fabricio se determinó un porcentaje de tejido linfoide dañado.

DETERMINACIÓN DE CALCIO Y FÓSFORO EN HUESO: Se tomo la tibia derecha de cada una de las 5 aves sacrificadas por tratamiento, sin músculos, tendones y cartílagos. Posteriormente fueron sumergidas en metanol absoluto durante 72 hrs, desengrasadas por el método de determinación del extracto etéreo ⁷⁸ deshidratadas en una estufa a 90 C durante 24 h, y sometidas a calcinación en una mufla a 500 C durante 24 h ⁷⁷. Para la determinación de calcio mediante espectroscopia de absorción atómica, la muestra fue preparada de acuerdo a la metodología AOAC ⁷⁷ (Método 971.09). Se pesaron 200 mg de cenizas, adicionando posteriormente 10 ml de ácido clorhídrico puro. Las muestras fueron sometidas a evaporación hasta sequedad, y resuspendidas en 20 ml de ácido clorhídrico 2 N. Posteriormente, el volumen de las muestras se aforó a 100 ml y las muestras se filtraron para su lectura en un espectrofotómetro de absorción atómica ⁷⁷. La determinación de fósforo se realizó de manera indirecta, mediante la medición del molibdeno después de la reacción del fósforo con molibdato ácido, con base en la metodología de Zaugg y Knox ⁷⁹: se tomó una alícuota de 2 ml de la muestra procesada para determinación de calcio, mas 0.5 ml de molibdato ácido y agua cbp 5 ml. A ésta mezcla se adicionaron 5 ml de 2-

octanol, agitándose posteriormente por 20 segundos. Posteriormente se agregó 1 ml de buffer de citrato y se agitó nuevamente. El 2-octanol fue removido y el molibdeno fue medido en la fase acuosa, produciéndose una relación inversamente proporcional de concentración de molibdeno ⁷⁹.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los ensayos de secuestro *in vitro* del experimento 1 fueron analizados mediante estadística no paramétrica, utilizando la prueba de Friedman, dado que no se cumplieron los supuestos básicos para aplicar una prueba paramétrica (distribución Normal, tamaño de muestra)

Para el experimento 2, los datos en porcentaje fueron transformados mediante la raíz cuadrada del arco seno para normalizar, posteriormente se utilizó una prueba de análisis de varianza univariado y una comparación de medias de Tukey

En la prueba biológica, los parámetros productivos (peso ganado y consumo de alimento) de las aves experimentales, se analizaron mediante una prueba de análisis multivariado denominada componentes principales (Análisis de factores) ⁸⁰, mediante el uso del paquete estadístico SPSS. Los resultados de bioquímica sanguínea fueron analizados mediante un análisis de varianza multivariado (MANOVA) ⁸⁰ utilizando el mismo paquete

Los hallazgos de patología macro y microscópica, así como el contenido de calcio y fósforo en hueso se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

3. RESULTADOS

PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS.

Aunque la evaluación experimental de la producción de micotoxinas no fue uno de los objetivos de ésta investigación, si fue una parte esencial para el desarrollo del trabajo. Bajo la metodología utilizada, se obtuvieron altos niveles de producción de ambas micotoxinas; se detectaron hasta 110 ppm de OA, cuantificada por HPLC, en trigo bajo las condiciones aquí descritas, mientras que de toxina T-2 se detectaron cantidades superiores a 500 ppm, cuantificada por el método de ELISA.

ANÁLISIS QUÍMICO ELEMENTAL DE LOS SECUESTRANTES.

Los resultados de pH del cuadro 1 muestran que todas las arcillas (aluminosilicatos) tienen un pH alcalino, variable desde 8 hasta 9.6, mientras que el producto basado en paredes celulares de levaduras (Mycosorb) tiene un pH de 5.6, probablemente debido a los carbohidratos de las paredes celulares. Como puede verse en el Cuadro 2, no parece existir relación entre el pH de Mycosorb y el secuestro de OA

Los aluminosilicatos utilizados presentan un contenido muy diferente de calcio, sodio y potasio. Zeotek presenta el nivel más bajo de Ca, mientras el valor más alto lo tiene el secuestrante Aflatox (0.56 %). Comalit muestra el nivel más alto de sodio (3.64 %) y Mycoad el más bajo (0.41%). Para todos los aluminosilicatos, el principal componente de su molécula es el silicio, que varía desde 20.87 hasta 37.76 %. El aluminio es el segundo principal componente de los aluminosilicatos, con valores

encontrados desde 3.75 hasta 6.7 %. El resto de los minerales son en realidad escasos en éstos productos (Ver figura 1).

CAPACIDAD DE SECUESTRO DE OA *IN VITRO*.

Experimento 1

Se observaron resultados variables según el método de extracción empleado. Se obtuvo un valor promedio de los resultados obtenidos en los tres ensayos en los que se empleó estándar de OA. En todos ellos, el secuestrante que se mantuvo relativamente constante en cuanto al secuestro de OA fue Zeotek, que dependiendo del método de extracción de la muestra, su capacidad de adsorción evaluada en porcentaje varió desde 63.31 hasta 98.36 %. El promedio fue el único valor superior al 80 % de adsorción, como puede observarse en la figura 2. Trisox fue el secuestrante con la más baja capacidad de secuestro de OA, resultando en prácticamente cero. El segundo mejor secuestrante fue Mycoad, con valores desde 43.18 hasta 80.05 % de secuestro de OA. Mycosorb resultó en general, un producto poco eficiente en el secuestro *in vitro* de OA.

Cuando se utilizó grano contaminado con OA, los resultados fueron ampliamente variables, dado que en algunos casos la concentración de OA no secuestrada por el adsorbente fue mayor que en el testigo (Ver cuadro 2). No es posible, por lo tanto, establecer alguna comparación entre las concentraciones obtenidas en los diferentes casos.

EXPERIMENTO 2

Los resultados de porcentaje de secuestro obtenidos por la metodología de ELISA se presentan en el cuadro 4. Las curvas de los estándares de OA y T-2 se muestran en las figuras 3 y 4. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los porcentajes de secuestro de OA por parte de Zeotek (100 %) y Mycofix (37.95 %). El porcentaje de OA secuestrada por Celtic (5.78 %) no fue estadísticamente distinto del grupo testigo. Respecto a T-2, sólo se encontró una capacidad de secuestro significativa de T-2 por parte de Zeotek, que fue diferente al grupo testigo, pero no se encontraron diferencias entre Zeotek, Mycofix y Celtic. Por otra parte, el porcentaje de secuestro de OA por Mycofix y Celtic no fue diferente a la concentración de OA encontrada en el grupo testigo (Ver figura 5).

EVALUACIÓN *in vivo*.

Se encontraron diferencias significativas en alguno de los elementos del modelo ($p < 0.001$). Esta diferencia no se debe a la inclusión de los secuestrantes ($p = 0.59$) lo que significa que no se encontró diferencia en el efecto de incluir un secuestrante en la dieta sin micotoxinas y no incluirlo, por lo cual podemos pensar, basados solamente en éste resultado, que los secuestrantes aquí estudiados no afectan significativamente la ganancia de peso o el consumo de alimento, como se muestra en el cuadro 5.

Si se observó un efecto de la inclusión de OA ($p = 0.000$), lo cual indica que las dietas contaminadas con 567 ppb de OA tienen un efecto detrimental en el peso y el consumo de alimento del pollo de engorda, como se observa en los cuadros 5 y 6.

Se observan diferencias estadísticas significativas entre las aves que consumieron toxina T-2 y las que recibieron una dieta libre de micotoxinas ($p < 0.001$). Este efecto en el peso y en el consumo es observable en los promedios para dichas variables, los cuales guardan una diferencia considerable con el grupo testigo. Esto indica que 927 ppb de toxina T-2 en dietas de pollo de engorda son lo suficientemente tóxicas para reducir significativamente el peso ganado y el consumo de alimento.

Cuando se combinó alguno de los secuestrantes utilizados en éste estudio con OA, la interacción de éstos factores no fue significativa ($p = 0.065$), lo cual implica que el incluir los secuestrantes empleados en éste estudio no potencializa el efecto de OA ni reduce su efecto tóxico.

Lo mismo sucedió cuando se combinó alguno de los secuestrantes con T-2. La interacción no resultó significativa ($p = 0.493$), lo cual significa que el incluir alguno de los secuestrantes no potencializa el efecto de T-2, pero tampoco lo antagoniza, lo cual sería el efecto esperado si los secuestrantes realmente funcionaran para ésta micotoxina.

No se encontró efecto de interacción entre OA y T-2 ($p = 0.695$). El efecto en la reducción de peso y consumo de alimento, como se observa en los cuadros 6 y 7, es un efecto aditivo resultado solamente de la suma de los efectos individuales de las micotoxinas. La interacción implicaría que el efecto de una micotoxina incrementa la toxicidad de la otra, o bien, que se reduzca la toxicidad de la segunda micotoxina, situación que, al menos bajo las condiciones de éste estudio, no fue observada.

La interacción de los tres factores implica que el combinar las dos micotoxinas mas un secuestrante potencializaría el efecto tóxico de ambas micotoxinas, o bien, lo antagonice. En los valores promedio de la combinación de OA y T-2 mas un secuestrante no se observa ni la potencialización del efecto tóxico aditivo de ambas micotoxinas, ni tampoco una reducción en el mismo, lo que significaría que el secuestrante tiene un efecto protector de la toxicidad de ambas micotoxinas. Tal efecto fue significativo en el análisis de varianza ($p = 0.029$)

Los efectos mencionados por secuestrante y por micotoxina fueron similares tanto en peso ganado como en consumo de alimento para todos los tratamientos.

Se observa cuando se utilizaron los secuestrantes Mycofix (T10) y Celtic (T14) en alimento contaminado con T-2, se tuvo un efecto parcialmente protector, lo cual se aprecia en la figura 6. El efecto en la ganancia de peso fue similar al observado en el consumo de alimento, visible en la figura 7.

BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Los datos promedio observados se pueden apreciar en los cuadros 8, 9 y 10. El análisis de varianza de éstos datos se presenta en el cuadro 11. El cuadro 8 presenta el efecto de cada secuestrante, donde es posible observar que al menos alguno de ellos tuvo un efecto sobre AST, albúmina y ácido úrico. ($p = 0.005$, 0.018 y 0.029 , respectivamente). Para poder detectar cuál de los secuestrantes produjo el efecto, se realizó una comparación de medias, en la que se observó una diferencia significativa entre los secuestrantes Mycofix y Celtic y el grupo testigo. Este hallazgo implica que los secuestrantes tal vez tengan un efecto de daño hepático que esté produciendo un

incremento en las concentraciones de AST plasmática. Sin embargo, al consultar información acerca de los valores normales de AST sanguínea, y compararla con los resultados obtenidos en éste estudio, se observa que el valor promedio de AST es de 230 UI, y cualquier valor mayor a éste se considera anormal. Por lo tanto, siendo el valor de AST en el grupo testigo el más elevado, y el cual es posible atribuirlo a algún componente tóxico del alimento, por lo que no puede tomarse en cuenta para comparar el resto de los tratamientos con el grupo testigo.

Respecto a OA, se encontró evidencia estadísticamente significativa de que 567 ppb de ésta micotoxina afectan las concentraciones plasmáticas de proteínas totales, albúmina y globulina, así como de ácido úrico ($p < 0.001$), y éstas concentraciones se ven afectadas en al menos alguno de los tratamientos que incluyeron OA, como se puede observar en el cuadro 9. Este hallazgo coincide con lo que se ha descrito previamente para OA en pollo de engorda, sin embargo, no coincide para el caso de AST, que en éste estudio no fue estadísticamente diferente del grupo testigo ($p = 0.974$).

Para el caso de toxina T-2, se encontró evidencia de que 927 ppb de ésta micotoxina afectan las concentraciones plasmáticas de todos los parámetros sanguíneos ($p < 0.01$) evaluados, inclusive ácido úrico, ($p = 0.038$) en al menos alguno de los tratamientos en que T-2 estuvo presente. Esta información coincide con lo mencionado en la literatura, y es debida al efecto de T-2 sobre los hepatocitos, principalmente. En cuanto al ácido úrico, la respuesta observada se atribuye a que éste metabolito es producido en el hígado, órgano afectado por T-2.

Se encontró que al menos alguno de los secuestrantes tiene una interacción significativa con OA en su efecto sobre proteínas totales ($p = 0.05$) y globulinas ($p = 0.036$). Lo mismo sucede con al menos alguno de los secuestrantes y toxina T-2 y el efecto de ambos sobre la albúmina ($p = 0.014$).

No se encontró evidencia estadísticamente significativa de que exista interacción entre los efectos de ambas micotoxinas sobre los parámetros evaluados ($p > 0.05$). La diferencia existente entre los valores obtenidos cuando se combinaron ambas micotoxinas y los valores obtenidos de ellas individualmente es el resultado de sus efectos aditivos.

Tampoco se encontró evidencia de que exista la interacción entre secuestrantes y las micotoxinas en combinación ($p > 0.05$). Al igual que en el anterior caso, los efectos observados son aditivos.

En el cuadro 10 se muestran los valores sanguíneos promedio encontrados en cada tratamiento. De acuerdo con ésta información, es posible observar que en todos los tratamientos que incluyeron OA, la concentración de PT, ALB y GL en plasma se encontró disminuida (figura 9), mientras que AU se encontró significativamente aumentado (figura 10). Los datos corroboran lo que se observó en los efectos por micotoxina.

PATOLOGÍA MACROSCÓPICA

Los resultados de los pesos relativos / 100 g de peso y de los diámetros proventriculares se muestran en los cuadros 12, 13, y 14. En los efectos por secuestrante no se observaron cambios, por lo que podemos decir que ningún

secuestrante afectó hígado, riñón o bolsa de Fabricio. Sin embargo, si hubo efecto de las micotoxinas (Cuadro 13) OA produjo un incremento en el peso relativo de riñón en todas las aves que consumieron ésta micotoxina. El efecto de OA se observó también en bolsa de Fabricio (BF) ($p=0.053$). El efecto de toxina T-2 sólo se observó sobre BF de las aves que consumieron ésta micotoxina. Cuando ambas micotoxinas fueron combinadas, los efectos sobre riñón y BF fueron más marcados. (Ver figura 11). En la figura 12 se representa gráficamente la relación entre diámetro de PV y MLL, y de la unión PV/MLL, datos que no mostraron ser diferentes en alguno de los tratamientos, por lo que es posible decir que no se encontró dilatación proventricular.

PATOLOGÍA MICROSCÓPICA

Los resultados de lesiones microscópicas en hígado, riñón, proventrículo y bolsa de Fabricio se presentan en los cuadros 15, 16 y 17. Se observó que en los grupos que incluyeron Zeotek y Celtic, se presentó un diámetro mayor de las glándulas proventriculares (Cuadro 15). Se observó, con una $p = 0.05$, que las células del epitelio de revestimiento de las glándulas proventriculares resultaron afectadas por el secuestrante MYCOFIX, con un menor diámetro incluso que el PV de las aves testigo. No se encontró evidencia estadística de que el resto de los parámetros evaluados en hígado, PV y BF sean diferentes.

Se encontró evidencia estadísticamente significativa de un incremento en el número de células tubulares renales en apoptosis/necrosis en los pollos que recibieron OA ($p<0.001$) (Ver cuadro 16). Este efecto no se observó para toxina T-2. Sin embargo, si se observó un mayor número de células en necrosis en las aves que recibieron ambas

micotoxinas. En hígado, se observó un mayor porcentaje de células tumefactas en los hígados de aves tratadas con OA sola y en combinación con T-2. No se observó diferencia significativa en el porcentaje de células tumefactas o en necrosis en aves tratadas con T-2. En cuanto al porcentaje de tejido de reparación, se observó mayor porcentaje de éste en las aves que recibieron OA sola y en combinación con T-2. No se encontró diferencia estadística en el resto de las observaciones ($p > 0.05$). En el número promedio de conductos biliares por espacio porta se observó diferencia estadística sólo en los hígados de las aves tratadas con T-2 ($p = 0.006$). Los efectos individuales de cada tratamiento pueden observarse en los cuadros 17 y 18. Gráficamente, el promedio de lesiones evaluadas puede observarse en las figuras 13 a 18, de acuerdo a cada tratamiento.

CALCIO Y FÓSFORO EN HUESO.

No se encontró evidencia estadísticamente significativa de que los porcentajes de calcio y fósforo en hueso sean diferentes cuando se utilizaron los secuestrantes en éste estudio. Por lo tanto, al menos bajo las condiciones experimentales aquí empleadas, los secuestrantes no afectaron el contenido de calcio y fósforo en hueso (Ver cuadro 19).

Tampoco se encontró evidencia estadística significativa de que OA y T-2 afecten el contenido de calcio y fósforo en hueso, ni aún cuando ambas micotoxinas fueron combinadas (Ver cuadro 20).

La diferencia encontrada en el contenido de calcio y fósforo en cada combinación de tratamientos no resultó estadísticamente significativa, por lo cual podemos decir que,

al menos bajo las condiciones del presente estudio, los secuestrantes utilizados no afectaron la deposición de Ca y P en hueso de éstas aves. Tal deposición tampoco fue afectada por alguna de las dos micotoxinas (Ver cuadro 21). Los resultados de porcentaje promedio de Ca y P en hueso de las aves experimentales se muestran gráficamente en la figura 20.

4. DISCUSIÓN

PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

Aunque no fue una variable a medir en éste trabajo, se observó una alta eficiencia en los métodos de producción de las micotoxinas estudiadas, por lo que se recomiendan éstos métodos en caso de requerir OA y T-2 para ulteriores trabajos al respecto. Los resultados fueron mejores que los obtenidos por Madhyastha *et al*⁷¹ para OA. Estos autores cultivaron *A. ochraceus* en maíz y trigo, a 28 C, por 30 días, y obtuvieron 74 y 72 µg/g de OA, respectivamente. Trenk *et al*³⁶ encontraron que la mayor producción de OA por parte de *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174, se alcanzó cuando se cultivó sobre trigo a 28 C después de 14 días. Bajo éstas condiciones encontró 1.47 mg de OA/g de trigo. Cuando se cultivó el mismo hongo a 20 C, la producción fue de 366 µg de OA/g de trigo³⁶, lo cual se acerca más a las condiciones en que se logró la producción de OA en éste estudio.

Respecto a toxina T-2, la producción obtenida en otros estudios ha sido también alta. Burmeister *et al*⁷⁴ produjeron 7.5 mg de T-2 por g de maíz, cuando cultivaron *Fusarium tricinctum* NRRL 3299 sobre maíz durante 21 días a 15 C. Cuando el hongo se incubó a 20 C, obtuvieron 1.2 mg de T-2 por g de maíz. Estos resultados son similares a los obtenidos por Lillehoj *et al*⁵⁴, quienes cultivaron *F. tricinctum* sobre maíz, durante 21 días a 15 C, y obtuvieron hasta 8.25 mg/g. En nuestro estudio se obtuvieron hasta 500 mg/kg de maíz, después de 3 semanas de incubación, lo cual fue suficiente para la realización del experimento *in vivo*. La calidad del grano y algunas características como humedad o variaciones de temperatura pueden ser responsables

de la variación en la producción de T-2 en éste estudio respecto a otros informes^{54, 74}

Dichas condiciones no fueron estrictamente controladas en el presente experimento.

ENSAYOS DE SECUESTRO *IN VITRO*

EXPERIMENTO 1

Mediante la prueba estadística de Friedman, no se encontró evidencia estadísticamente significativa de que la adsorción de OA por parte de alguno de los secuestrantes sea diferente. Esta diferencia resultó únicamente numérica, y en la mayoría de los casos no coincide con lo mencionado para cada secuestrante por parte de sus fabricantes. Por otra parte, dada la variabilidad de los resultados obtenidos con los diferentes métodos extracción de la muestra, la confiabilidad del ensayo *in vitro* como método de evaluación de un secuestrante es cuestionable, lo cual coincide con lo mencionado por Osuna⁸¹ respecto a las pruebas *in vitro*. Es importante considerar el uso de un testigo negativo, conteniendo la misma solución de contacto y micotoxina, pero sin secuestrante, que debe ser procesado y cuantificado como cualquiera de las muestras. De ésta manera, el valor de la toxina recuperada en éste testigo será considerada el cien por ciento de micotoxina de la cual partimos, y los cálculos para cada secuestrante deben ser realizados con base en dicho testigo. De no hacerlo así, la micotoxina perdida durante el proceso de extracción será considerada como secuestrada, lo cual nos arrojará un resultado falso²⁰.

El secuestrante que numéricamente presentó una mayor capacidad de secuestro *in vitro* de OA fue Zeotek, el cual es ampliamente recomendado por sus fabricantes para

el secuestro de OA, situación que, al menos para condiciones *in vitro*, coincide con lo obtenido en éste estudio.

Dado que no existe una metodología bien establecida para la realización del ensayo de secuestro de micotoxinas *in vitro*, existe cierta diversidad en los métodos desarrollados por cada laboratorio^{66 68 82}. Los resultados observados en este estudio cuando se confrontaron los secuestrantes con alimento contaminado con OA resultaron ampliamente variables, dado que la distribución de cualquier micotoxina no es homogénea en el grano, por lo que no es recomendable realizarlo de ésta manera. El utilizar estándar de micotoxina pura es un procedimiento que garantiza la cantidad de micotoxina con la que se confronta el secuestrante, pero es un procedimiento costoso que definitivamente no es comparable con las condiciones presentes en desafíos *in vivo*²⁰.

La mayor parte de los secuestrantes evaluados presentaron pH alcalino, lo cual parece favorecer el secuestro de ciertas micotoxinas. La literatura menciona que para la extracción de OA se requieren condiciones de pH en que existan cambios de acidez a alcalinidad⁸². Sin embargo, la adsorción de OA no parece ser afectada por el pH del aluminosilicato cuando se encuentra suspendido en agua bidestilada, por lo que, de acuerdo a lo observado, no existe relación entre el pH del secuestrante y la capacidad de secuestro de la OA. Este resultado coincide con lo señalado por Lechuga *et al.*⁶⁹ para el caso de aflatoxina B1 (AFB1).

El contenido de minerales de un aluminosilicato es bastante variable considerando que éstos productos son obtenidos de los depósitos naturales de arcillas, en los que,

naturalmente, no es posible controlar la composición química ⁶⁷. El análisis de la composición química debería ser considerado por los fabricantes de éstos productos como una de las herramientas en el control de calidad de los aluminosilicatos, dado que, aunque algunos de éstos productos incluyen en su etiqueta un porcentaje de minerales garantizado para su producto, básicamente aluminatos, silicatos, y sales de sodio, potasio y calcio ^{7, 67}, la composición de un lote a otro, incluso dentro del mismo producto, no es la misma. Asimismo es de importancia saber si alguno de los minerales contenidos en los aluminosilicatos puede interferir con los minerales de la ración. Algunos autores han señalado que los aluminosilicatos pueden funcionar como promotores de crecimiento ⁸⁴, y algunos otros han mencionado mejorías en la calidad del huevo en gallinas de postura, dado el incremento en los valores de calcio en la dieta resultado de su inclusión ⁸⁵. Por éste motivo resulta importante para los compradores de aluminosilicatos el conocer el contenido de minerales del producto, lo cual, para algunos productos no es posible.

EXPERIMENTO 2

En los desafíos *in vitro* utilizando el método de ELISA, la capacidad de adsorción de Zeotek resultó similar a lo obtenido por HPLC, siendo éste secuestrante el de mayor capacidad de secuestro (100 %) de OA bajo condiciones *in vitro*. Los otros dos secuestrantes evaluados no resultaron tan eficientes en el secuestro *in vitro* de OA.

Para el caso de T-2, ninguno de los secuestrantes fue eficiente, dado que el que mayor capacidad de secuestro mostró fue solo de 8.67 %. Cabe mencionar que los fabricantes establecen que su producto secuestra el 64 % de toxina T-2 evaluada por

cromatografía de gases, lo cual no fue posible demostrar bajo las condiciones de éste trabajo. Existen controversias acerca del uso de la metodología de ELISA para cuantificar la micotoxina libre en desafíos de secuestro *in vitro*⁸², dado que el sistema de anticuerpos es muy sensible a pH ácido, proveniente de la solución de contacto (ácido clorhídrico 0.075 N). Para evitar ésta situación, en éste trabajo se neutralizó el pH previo a la determinación de micotoxina libre.

De acuerdo con los resultados obtenidos tanto en el experimento 1 como en éste ensayo con el método de ELISA, es posible observar la amplia variabilidad en el denominado desafío de secuestro *in vitro*. Con éstas consideraciones, es una técnica que no es recomendable dada su baja confiabilidad.

El propósito de utilizar el desafío *in vitro* era el tener un valor de referencia sobre el cual decidir que secuestrantes probar en el experimento *in vivo*²⁰. Sin embargo, dados los resultados, se decidió por seleccionar los productos más ampliamente recomendados en el mercado para el secuestro de OA y tricotecenos, particularmente T-2. No es posible, por lo tanto, predecir el comportamiento de un secuestrante en una situación de campo con un resultado de secuestro *in vitro*. Ledoux y Rottinghaus²⁰ establecieron ciertos criterios para la evaluación de los secuestrantes de micotoxinas *in vitro*. De acuerdo con ellos, aquellos secuestrantes que muestren una adsorción de micotoxinas *in vitro* superior al 80 % deben considerarse para evaluarse *in vivo*, y no considerar para éstas pruebas a todos aquellos cuyo porcentaje de secuestro *in vitro* sea inferior a éste valor. En éste trabajo se siguió dicho criterio sólo para el secuestrante Zeotek, que fue el de la más constante capacidad de secuestro en los

experimentos 1 y 2. Celtic y Mycofix fueron seleccionados por información previa de sus fabricantes respecto a su actividad protectora contra OA y T-2.

Finalmente, es importante considerar que la evaluación *in vitro* es un sistema de evaluación de secuestrantes que trata de simular las condiciones presentes en el organismo del ave, pero si un secuestrante presenta una buena adsorción *in vitro* no implica que sucederá lo mismo *in vivo*. Algunos autores^{20 81} han enfatizado esta situación, dado que en los animales se presentan otras variables ausentes bajo condiciones *in vitro*, se hace necesaria la evaluación *in vivo* para obtener un resultado más preciso y sobre todo más cercano a la realidad.

PESO GANADO Y CONSUMO DE ALIMENTO

Los resultados coinciden con estudios anteriores^{15 20} en los que aluminosilicatos han sido confrontados con OA, en los cuales al comparar al grupo testigo con todos aquellos tratamientos con OA, se observó una diferencia significativa. Esta diferencia muestra claramente que OA no es adsorbida por alguno de los secuestrantes utilizados. En estudios conducidos por Huff *et al*¹⁵ se utiliza como fuente de OA al estándar empleado para pruebas de laboratorio. Bajo tales condiciones, no se encontró un efecto protector de los secuestrantes empleados sobre los efectos tóxicos de OA. Se ha mencionado que las evaluaciones *in vivo* deben realizarse con dosis elevadas de micotoxina, para determinar si un secuestrante tiene capacidad de protección²⁰. Sin embargo, nosotros consideramos que dichas dosis no se presentan con frecuencia en condiciones naturales. En éste trabajo, utilizando una dosis de 567 ppb, que es la sexta parte de lo empleado en otras investigaciones, y que

es factible de presentarse en condiciones naturales, encontramos efectos tóxicos significativos y característicos de OA. Sin embargo, existe una gran divergencia entre los estudios conducidos bajo ésta metodología y aquellos en que se empleó grano contaminado en el que se cultivo y desarrolló al hongo productor de la micotoxina ⁷¹. Esta condición es lo más cercano a la realidad, dado que naturalmente las micotoxinas no se presentan aisladas, como sucede en los casos en que se emplea el estándar de la micotoxina, sino que se presentan diversos metabolitos, la mayoría tóxicos y desconocidos, e inclusive no identificables por el laboratorio, aún cuando la micotoxina principal sea la que se encuentre en mayor cantidad. Huff ⁸⁶ no encontró efectos negativos sobre la ganancia de peso o consumo de alimento cuando alimentaron aves con 0.5 ppm de OA. En éste trabajo sí se encontraron efectos detrimentales sobre el peso ganado y el consumo de alimento, lo cual puede deberse a que la micotoxina a éste nivel es tóxica para el pollito, efecto mencionado por Leeson *et al.* ³, o bien, debido a los otros metabolitos menores y no identificables, pero también presentes en el grano contaminado, lo cual coincide con Rotter ⁷¹. La comunidad europea ha considerado un nivel máximo de tolerancia para OA de hasta 5 ppb en países donde OA es problema ²⁹

En cuanto a toxina T-2, con 927 ppb se observó una reducción significativa de la ganancia de peso y del consumo de alimento. Bajo las condiciones de éste trabajo, no se encontraron lesiones ulcerativas significativas en las aves

Para toxina T-2 los pesos de las aves y su consumo de alimento son estadísticamente distintos del grupo testigo, pero significativamente distintos del grupo con sólo T-2, lo

cual implica que al menos dos de los productos evaluados tuvieron un efecto protector. La presentación de úlceras se ha considerado característica de toxina T-2. En éste trabajo, utilizando 927 ppb de ésta toxina, y durante 3 semanas de alimentación, las aves no desarrollaron úlceras de forma significativa. La presentación de éste tipo de lesiones puede ser, por lo tanto, dependiente del tiempo de exposición y de la dosis encontrada en el alimento. En éste trabajo se observó un efecto de protección parcial de dos secuestrantes contra T-2. Sin embargo, se ha mencionado que el principal efecto de T-2 para la presentación de úlceras, es por contacto. Si un ave presenta éste tipo de lesiones en boca y lengua, se reduce su consumo de alimento y como consecuencia la ganancia de peso. Estos efectos son difíciles de contrarrestar por un secuestrante, dado que éstos pueden reducir sus efectos sistémicos que son resultado de las interacciones moleculares a nivel intestinal de los secuestrantes y las micotoxinas en solución. Siendo ésta la situación bajo la cual los secuestrantes ejercen su efecto, resultaría ampliamente difícil contrarrestar los efectos ulcerativos de T-2, dado que el sitio en que sería secuestrada se encuentra posterior al sitio donde ejercen su primer efecto, que es la cavidad oral^{2 3 60}.

Cuando las aves recibieron la combinación de ambas micotoxinas, el efecto observado fue más marcado en cuanto a la depresión de la ganancia de peso y del consumo de alimento. Las aves fueron consistentemente más pequeñas, y ningún secuestrante fue capaz de contrarrestar el efecto de ambas micotoxinas. Este resultado coincide con lo obtenido por *Kubena et al.*⁸⁷ y *Devegowda et al.*⁶⁶ cuando se probaron las dos micotoxinas conjuntamente. *Kubena et al.*⁸⁷ encontraron efectos aditivos para

ganancia de peso y consumo de alimento, utilizando 2 ppm de OA y 4 ppm de T-2, ambas puras. Éste efecto aditivo ha sido previamente discutido, y en el presente trabajo la diferencia entre los pesos de los pollos alimentados con OA y T-2 individualmente respecto a aquellos pollos alimentados con ambas micotoxinas coincide con la diferencia numérica de la adición de los efectos individuales de ambas micotoxinas. Algunos autores han mencionado un sinergismo o antagonismo entre OA y otras micotoxinas, dependiendo del parámetro evaluado y de la micotoxina. Por ejemplo, aflatoxina B1 (AFB1) y OA resultaron sinérgicas en cuanto al peso corporal, según experimentos realizados por Huff *et al.*⁸⁸ Para parámetros de bioquímica clínica, Kubena *et al.*⁸⁷ mencionaron un efecto sinérgico entre OA y T-2, lo cual se discutirá más adelante.

BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Aspartato Amino transferasa (AST).

Es una enzima que cataliza la transaminación de L-aspartato y 2-oxoglutarato a oxalacetato y glutamato⁸⁹. Esta enzima se distribuye en tejidos de diferentes órganos: hígado, músculo esquelético, cerebro y corazón⁹⁰. De acuerdo con la literatura, cualquier valor de AST por encima de 230 UI/L se considera anormal. Lumeij⁹¹ considera el valor de referencia normal de AST en pollos de 174 UI/L. La literatura respecto a bioquímica sanguínea y micotoxinas ha reportado valores de 130 a 170 UI de AST^{66, 49, 87}. Cuando observamos los efectos principales del factor 1 (secuestrantes) observamos una diferencia significativa entre los valores de AST para el grupo testigo y para dos secuestrantes. Sin embargo, cuando se utiliza uno de ellos, Celtic, los

valores de AST son más cercanos al valor mencionado como límite normal. Definitivamente el grupo testigo y las aves que recibieron ZEOTEK® se encuentran por encima de los límites de referencia. AST puede encontrarse aumentada por enfermedad hepatocelular, deficiencia de vitamina E, intoxicación con pesticidas y daño en músculo esquelético⁹⁰. Considerando a su vez los resultados de histopatología, que se discutirá más adelante en éste mismo trabajo, los hígados de las aves del grupo testigo se encontraron con daño (tumefacción), aunque no fue significativo. Este daño pudo haber sido causado por algún componente tóxico del alimento, posiblemente otras micotoxinas no identificadas que no fueron detectadas en el análisis realizado. El efecto que se observa en la reducción del valor de AST en la sangre de aves tratadas con CELTIC podría ser debido a cierta protección conferida por el secuestrante contra los metabolitos no identificados, si efectivamente éstos se encuentran presentes. Ritchie *et al.*⁹⁰ recomiendan medir la enzima Creatin-cinasa para descartar daño en músculo esquelético, lo cual no fue realizado en éste estudio. Estos resultados no coinciden con lo mencionado en reportes previos, en que AST se ha encontrado por debajo de los valores límite de referencia^{66, 49, 87}. Dado que en el grupo testigo encontramos la elevación mencionada, no podemos atribuir su incremento o decremento a la presencia de micotoxinas y no funcionó como indicador de integridad hepatocelular en éste estudio.

PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES (PPT). El sitio de síntesis de proteínas plasmáticas es principalmente el hígado, mientras que el sistema inmunológico es el

segundo sitio más importante. En términos generales, la concentración de proteínas en el plasma es del 5-7 %, sin incluir hemoglobina ⁹². La disminución en la concentración de PPT puede deberse a hepatopatías crónicas, mala absorción de nutrientes, enteropatías, deshidratación, enfermedad renal, ayuno o desnutrición ⁹⁰. Se ha mencionado que OA afecta la síntesis de proteínas cuando la molécula de OA compite con fenilalanina ligada al RNAt durante la síntesis de proteínas ⁴⁹. Diversos autores han encontrado valores de PPT que varían desde 23.9 g/L según lo mencionado por Devegowda *et al.* ⁶⁶ hasta 27.2 g/L ¹⁵ para aves no tratadas. En este estudio se obtuvieron 26.53 g/L en las aves testigo, lo cual coincide con los trabajos mencionados previamente. Huff *et al.* ¹⁵ encontraron 17.5 g/L de PPT en aves tratadas con 2 ppm de OA, y 18.3 g/L en aves tratadas con OA y un secuestrante al 0.5 %. Devegowda *et al.* ⁶⁶ encontraron 21.4 g/L de PPT cuando alimentaron aves durante 21 días con 2 ppm de OA, lo cual coincide con lo obtenido en éste estudio en aves alimentadas con 567 ppb de OA (21.2 g/L). Los valores de PPT de aves tratadas con OA mas secuestrantes se encontraron significativamente reducidos, lo que implica que no funcionaron en la protección de hígado hacia OA. Para el caso de toxina T-2, en éste estudio se encontró una reducción significativa de los valores de PPT, lo cual coincide con los experimentos realizados por Kubena *et al.* suministrando 8 ppm de T-2 ⁶², en los cuales encontraron valores de PPT de 22.6 y 24.3 g/L respectivamente, que fueron significativamente distintos a sus grupos testigo. Sin embargo, Bailey *et al.* ¹⁴ y Devegowda *et al.* ⁶⁶ no encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de PPT de aquellos pollos alimentados con 8 y 3 ppm, respectivamente, y los

grupos testigo T-2 ha sido mencionada como un potente inhibidor de la síntesis de proteínas por la unión de la molécula de T-2 con la enzima peptidil transferasa ⁹³, involucrada en los pasos de elongación y terminación de la síntesis de proteínas a nivel ribosomal ³ Esta inhibición es dependiente de la dosis de T-2 y del tiempo de exposición. En éste trabajo, sí se encontró tal reducción al menos en las proteínas del plasma, con la dosis utilizada de T-2. La diferencia entre el resultado obtenido en el presente estudio y los trabajos de Bailey *et al.*¹⁴ y Devegowda *et al.*⁶⁶ podría ser debida a que ellos emplearon toxina T-2 purificada, mientras en el presente trabajo se empleó grano contaminado con el hongo productor de T-2, que, aunque contiene ésta micotoxina en mayor cantidad y es la de mayor importancia, no contiene exclusivamente la micotoxina mencionada.

ALBÚMINA (ALB) es la proteína más prominente del plasma, primordialmente sintetizada en hígado. En aves, albúmina representa del 35-50 % del total de las proteínas del plasma, y ha sido un parámetro de elección en estudios de micotoxicosis, dado que los valores de ALB se reducen en caso de enfermedad hepática crónica ^{90 92}

A menudo cuando el valor de PPT se encuentra dentro de los valores de referencia, ALB está reducida, y la relación ALB/GLB aumenta ⁹². Los valores de ALB de las aves testigo en otros estudios han sido los siguientes: Huff *et al.* ¹⁵ encontraron 11.3 g/L; Bailey *et al.* ⁴⁹ mencionaron 11.3 g/L. En este trabajo se encontraron 10.4 g/L. La concentración de ALB se encontró significativamente reducida en aves tratadas con 2 y 4 ppm de OA, con valores de 7 y 4.6 g/L, respectivamente según los mismos reportes. En este trabajo se encontraron valores de 8 g/L en aves que consumieron

OA Esta diferencia puede deberse a la baja dosis de OA utilizada en éste estudio, en comparación con los estudios mencionados previamente. ALB también es afectada por toxina T-2 de acuerdo con lo reportado por varios autores ^{14, 87}, siendo de 11.8 y 10 g/L con 4 y 8 ppm de T-2, respectivamente. En este trabajo se encontraron valores de 9.5 g/L en aquellas aves que recibieron T-2, sin importar si recibieron o no secuestrante. Aves que recibieron T-2 exclusivamente, no mostraron cambios significativos en ALB y GLB, pero sí aquellas que recibieron T-2 más Zeotek y Mycofix.

Las GLOBULINAS, clasificadas como α , β y γ , son también sintetizadas en hígado, y han sido ampliamente estudiadas y divididas mediante electroforesis en diferentes fracciones: en las alfa-globulinas se encuentran las lipoproteínas de alta y muy baja densidad, ceruloplasmina y antitrombina, entre otras ⁹². En la fracción beta se encuentran las lipoproteínas de baja densidad, fibrinógeno y proteínas del complemento, mientras que en la fracción gamma se encuentran las inmunoglobulinas ^{43, 92}. Estas proteínas no han sido evaluadas en otros trabajos involucrando éstas micotoxinas, aunque en éste estudio sí se encontró una reducción estadísticamente significativa de GLB en aves que consumieron tanto OA como T-2.

ÁCIDO ÚRICO (AU) es el principal producto de eliminación del nitrógeno en aves, el cual es sintetizado en hígado mediante una serie de pasos metabólicos de la síntesis de purinas. Los túbulos renales secretan AU a la orina, por lo que un daño a dicho nivel producirá una disminución en la excreción de AU y su incremento en plasma ^{43, 91}. Los valores de AU en sangre se encuentran entre 297 y 594 $\mu\text{mol/L}$ (5-10 mg/100 ml)

⁹⁴ En estudios realizados con OA se han encontrado valores de 685.2 $\mu\text{mol/L}$ ⁶⁶, que

son ligeramente más elevados que los encontrados en éste estudio (628.8 $\mu\text{mol/L}$) para el grupo testigo. Sin embargo, en todas aquellas aves que recibieron OA se encontró un incremento de AU estadísticamente significativo (1086.75 $\mu\text{mol/L}$). En aves recibiendo exclusivamente OA se encontró un valor de 1940.2 $\mu\text{mol/L}$, por mucho más elevado que los valores encontrados en otros trabajos^{15 49}. AU se encontró dentro de los valores de referencia cuando se administró T-2, lo cual demuestra que T-2 no afecta el riñón, y el daño hepático no es suficiente para producir un incremento en el valor plasmático de AU. Este resultado coincide con informes previos. Kubena *et al.*⁸⁷ encontraron 629.89 $\mu\text{mol/L}$ de AU con 4 ppm de T-2 por 21 días, valor que no fue estadísticamente diferente del grupo testigo. Edrington *et al.*¹³ encontraron 297.4 $\mu\text{mol/L}$ de AU con 8 ppm de T-2. Estos resultados implican que T-2 purificada debe estar presente en una concentración superior a 8 ppm para producir incremento en el valor de AU plasmático.

No se observó efecto de interacción entre OA y T-2 sobre alguno de los parámetros sanguíneos evaluados, pero sí se observaron, al igual que para ganancia de peso, efectos de aditividad. Este dato concuerda con lo reportado por Kubena *et al.*⁸⁷ y Devegowda *et al.*⁶⁶. En el primer trabajo se encontró un efecto de interacción sobre gamma-glutamilo transferasa, calcio y triglicéridos, parámetros que no fueron evaluados en éste estudio.

PATOLOGÍA MACROSCÓPICA

En la evaluación macroscópica de las aves experimentales, las principales lesiones consistieron en palidez hepática y renal de las aves de los grupos tratados con OA y T-

2, aunque no todas las aves de dichos grupos presentaron lesiones. Estos hallazgos nos indican que en aves de 21 días de edad, y bajo las condiciones de éste estudio, con las dosis utilizadas no se producen lesiones macroscópicas significativas en los órganos reconocidos como primordialmente afectados por OA, hígado y riñón.

En la evaluación de los pesos relativos de hígado, bolsa de Fabricio, proventrículo y molleja, y riñón, sólo éste último se encontró significativamente aumentado de tamaño en aves alimentadas con OA. El incremento en el peso relativo de riñón coincide con lo mencionado por otros autores^{66 87}. Huff *et al*⁸⁶ mencionaron un aumento en el peso relativo de hígado, proventrículo y molleja, y un decremento en el peso de la bolsa de Fabricio. Estos autores utilizaron dosis de OA de 2 ppm durante 20 días. De acuerdo a éstos resultados, y lo obtenido en éste estudio, los efectos de OA sobre los diferentes órganos son dependientes del tiempo de exposición y de la dosis, dado que la concentración de OA en éste estudio no fue tan alta como la empleada por otros autores, y mencionadas por producir lesiones macroscópicas obvias de ocratoxicosis, tales como la deposición de uratos en serosas, nefromegalia severa y palidez hepática. En condiciones de campo no es muy factible encontrar dosis tan elevadas, ni mortalidades elevadas debido a OA. La dosis de OA empleada en éste estudio es más parecida a lo que ocurre en condiciones naturales.

OA ha sido mencionada por afectar el hígado, como cualquier tóxico^{30, 47}. Macroscópicamente se observaron hígados pálidos en algunas aves, aunque no específicamente de los tratamientos con OA. En éste trabajo no se observaron hígados friables, como se ha señalado en la literatura con dosis de OA más elevadas³⁴.

Asimismo, el peso relativo de los hígados no fue significativamente distinto entre aves tratadas con OA y aves testigo, lo cual si ha ocurrido en otros estudios con OA ^{34 47}. El PR de PV y MLL no se encontraron aumentados. Aunque se ha reportado previamente la dilatación de PV en pollos adultos alimentados con 1.5 ppm de OA durante 3 semanas ⁹⁵, en éste estudio no se observó tal dilatación, la cual fue medida por el diámetro de la dilatación PV-MLL. Tal lesión, al igual que otras no observadas en éste estudio, parece ser dependiente de tiempo de exposición y dosis de micotoxina.

PATOLOGÍA MICROSCÓPICA

HÍGADO: las lesiones encontradas en hígado corresponden básicamente a daño crónico, siendo la principal lesión la hiperplasia de conductos biliares, la cual ha sido ampliamente mencionada, entre otras muchas causas, por presencia de OA, T-2 u otras micotoxinas ^{2 3 30 47}, lo cual confirma el efecto de OA y T-2. Esta hiperplasia consiste en el incremento en número de los canales biliares dentro y alrededor de las vías portales, y que aparecen como una respuesta inespecífica al daño crónico hepatocelular ⁹⁶. Esta lesión es el resultado de un contacto prolongado con un agente tóxico y produce la necrosis de los hepatocitos tumefactos, y su substitución por tejido de reparación que incluye tejido fibroso y epitelio de conductos biliares, que es menos especializado y más rápidamente reemplazado que el tejido parenquimatoso ⁹⁶. Todas éstas lesiones (tumefacción, necrosis, fibrosis y proliferación de conductos biliares) han sido mencionadas presentes en casos de intoxicación por T-2 y OA ^{2,3}, y en éste trabajo, se observó éste tipo de lesiones con ambas micotoxinas probadas. La tumefacción de los hepatocitos es una lesión previa a la necrosis, efecto también

observado y reportado en casos de hepatotoxicosis, como intoxicación por micotoxinas

⁹⁶ Las lesiones en hígado corresponden con la reducción de la concentración de proteínas plasmáticas y con el incremento de AST. Las lesiones observadas en aves tratadas con OA fueron tumefacción, principalmente, en algunos casos superior al 80 % del campo observado, en los tratamientos con OA con y sin secuestrante. No se observó hiperplasia de conductos biliares de forma significativa en aves alimentadas con OA sin secuestrante. Tampoco se presentó un mayor porcentaje de lesiones cuando se combinaron ambas micotoxinas, tal vez debido a que el daño por tumefacción ya se convirtió en daño crónico. Es interesante notar que en aquellos tratamientos en que se utilizaron Zeotek y Mycofix sin micotoxinas se observó tumefacción de los hepatocitos en mayor proporción que en el grupo testigo, lo cual nos hace pensar en un daño *per se* de los secuestrantes. Se ha mencionado como una de las posibles desventajas del uso de aluminosilicatos como secuestrantes, la presencia de metales pesados o de dioxinas que podrían estar presentes en el aluminosilicato desde el momento en que son obtenidos de minas ¹⁷.

RIÑÓN. Los cambios observados principalmente fueron referidos a las células tubulares, en donde se encontró que aquellos tratamientos con OA presentaron un porcentaje más alto de células en apoptosis o necrosis en el epitelio tubular renal, lo cual es una lesión consistente con los informes previos ^{2, 3, 47, 97}. Esta lesión se observó en todos los tratamientos que incluyeron OA con o sin secuestrante, o bien combinada con T-2. Una lesión reportada como común durante ocratoxicosis es el engrosamiento de la membrana basal del glomérulo ^{2 3 30, 47}. En éste estudio se realizó la medición del

diámetro glomerular mayor y del diámetro del ovillo, perpendicular a la entrada de la arteria aferente, con la finalidad de detectar un incremento en la proporción del espacio total ocupado por el glomérulo, sin que se encontrase una diferencia entre el grupo testigo y el resto de los tratamientos. Con éstas observaciones es posible afirmar que OA fue lo suficientemente tóxica en túbulos renales para producir cambios histológicos significativos, por lo que los secuestrantes no protegieron a las aves de los efectos tóxicos de OA.

T-2 no produjo lesiones significativas en túbulos renales, lo cual es consistente con los efectos reportados para T-2 ^{2, 3 60}, dado su carácter de ser primordialmente una toxina del sistema hematopoyético. Este efecto no puede atribuirse a los secuestrantes dado que las aves tratadas con T-2 exclusivamente tampoco presentaron lesiones.

PROVENTRÍCULO (PV)

Se ha mencionado la dilatación de las glándulas proventriculares en aves alimentadas con 1.5 ppm de OA por 3 semanas ⁹⁵. Goodwin ⁹⁸ ha mencionado la distensión de las glándulas proventriculares en aves intoxicadas con OA, tricotecenos y aminos biogénicas, además de hiperplasia e hipertrofia del epitelio de revestimiento con éste tipo de tóxicos. En éste estudio éste tipo de cambios en PV no fueron significativos en las aves alimentadas con dietas contaminadas con OA y T-2, pero sí se observó en el PV de las aves que recibieron MYCOFIX un menor diámetro en el epitelio de revestimiento, y fue diferente al grupo testigo. Este tipo de cambios en PV pueden favorecer la mala absorción de nutrientes, dado que un daño a nivel glandular en PV tiene un efecto directo sobre la digestión del alimento, lo que tiene un efecto

detrimental sobre la absorción de éstos en intestino. Esta condición puede reflejarse en la reducción de la tasa de crecimiento del pollo alimentado con micotoxinas. Sin embargo, bajo las condiciones de éste estudio, la pobre ganancia de peso de los pollos alimentados con OA y T-2 no pareció deberse a un efecto sobre PV.

BOLSA DE FABRICIO

Hoerr *et al.*³⁰ suministraron una dosis única (2.5 mg/kg) de toxina T-2 en pollos de 7 días, siendo la necrosis tanto de tejido linfoide como de tejido epitelial de la BF. Se ha observado depleción y atrofia de los órganos linfoides en aves intoxicadas naturalmente con 2.5 ppm de T-2³. OA también se ha reportado por producir atrofia de BF^{2,3,98}. En éste estudio, no se observaron cambios significativos en BF con las dosis empleadas, por lo cual los efectos sobre BF tanto de T-2 y OA son dependientes de la dosis y el tiempo de exposición. La atrofia del tejido linfoide se ha mencionado por múltiples agentes causales, incluyendo el estrés⁹⁹, por lo que la afectación en algunos casos del 30 por ciento del tejido linfoide en BF observado en éste estudio no puede ser atribuida a micotoxinas o secuestrantes.

CALCIO Y FÓSFORO

En algunos estudios se ha mencionado una reducción significativa del contenido de cenizas en hueso en aves que recibieron OA⁶⁶. Otros autores han mencionado una reducción en la resistencia de los huesos a la ruptura, como resultado de desmineralización, lo cual se ha atribuido a una alteración en el metabolismo de la vitamina D₃^{2,3} la cual participa activamente en el metabolismo de ambos minerales⁹⁴. Por otro lado, cuando se utilizan aluminosilicatos en dietas sin micotoxinas, algunos

autores han encontrado incremento en la ganancia de peso del pollo, lo cual se ha atribuido al aporte de minerales del aluminosilicato ⁸⁴ En éste trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los contenidos de calcio y fósforo en tibia en aves tratadas con aluminosilicato ni en aquellas tratadas con micotoxinas respecto al grupo testigo. Los aluminosilicatos presentan un contenido variable de calcio, dependiendo del producto Zeotek, por ejemplo, presentó 0.02 % de calcio, que es un valor bajo para considerar un aporte significativo de éste mineral en la dieta, por lo cual podemos pensar que no tuvo un efecto en la mejoría del peso ganado por el pollo. Probablemente la dosis de ambas micotoxinas no fue lo suficientemente alta para provocar problemas en el metabolismo de Ca y P, al menos hasta los 21 días que duró la prueba.

5. CONCLUSIONES

Los ensayos de secuestro *in vitro* no son una prueba confiable para la valoración de la efectividad de un secuestrante de micotoxinas, dada la amplia variabilidad de los resultados obtenidos por diferentes metodologías.

El efecto protector de los secuestrantes sobre los pollos de engorda en dietas contaminadas con OA y T-2 no puede predecirse mediante el desafío de secuestro *in vitro*. No existe una correlación entre la efectividad de un secuestrante en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

La composición química elemental de los aluminosilicatos es también muy variable y no es monitoreada en muchos de los productos comercializados.

Los secuestrantes utilizados en dietas no contaminadas con micotoxinas no parecen afectar la ganancia de peso en pollos de 0-21 días.

Los efectos tóxicos de 597 ppb de OA en pollos de engorda, visibles en cuanto a ganancia de peso, consumo de alimento, integridad y funcionalidad de hígado y riñón, no pueden ser contrarrestados con el uso de secuestrantes, inclusive los de más reciente aparición en la industria de los alimentos balanceados para animales.

La toxicidad de 927 ppb de T-2 fue parcialmente contrarrestada por dos de los secuestrantes empleados en éste estudio, al menos durante los primeros 21 días de vida del pollo de engorda.

Por lo tanto, hasta el momento, lo más recomendable para contrarrestar los efectos de OA y T-2 es la prevención de su formación en el grano utilizado para la alimentación o el alimento terminado.

6. LITERATURA CITADA

- (1) Richard, J, editor. Mycotoxins - an overview Romer™ Labs, Inc. USA 2000
- (2) Hoerr FJ, Micotoxinoses. In: Calnek BW, Barnes JH, Beard CH, McDougald LR, Saif YM, editors. Diseases of poultry. 10th ed. Ames, Iowa:Iowa State University Press, 1997
- (3) Leeson S, Díaz G, Summers JD. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Guelph:University books, 1995.
- (4) Jones F. Mycotoxins in feeds. In: Coelho BM, editor Molds, mycotoxins and feed preservatives in the feed industry. 2nd. ed, New Jersey:BASF Corporation, 1996, 15-26.
- (5) Robb J Mycotoxins: contamination and decontamination. Feed mix 1993;1:18-23
- (6) Doyle MP, Applebaum RS, Brackett RE, and Marth EH. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities Journal of Food protection 1982;45:964-971.
- (7) Camarena G, Domínguez MJ, Díaz LJ, Flores CM. Adsorción diferencial de aflatoxinas B1 y G1 por 10 materiales adsorbentes. Memorias de la XXII Convención Anual ANECA; 1997 mayo 7-11; Ixtapa, Zihuatanejo (Guerrero) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1997: 302-310.
- (8) Reyes QM, Rocha HA, Corona GS, Zentella PM, Rosiles MR. Efecto de los aluminosilicatos utilizados en dietas contaminadas con aflatoxina B1 y de la restricción alimenticia sobre el glutatión sanguíneo de pollos de engorda. Memorias

de la IV Jornada Médico Avícola; 1993 agosto 4-6; México (DF): Departamento de Producción Animal:Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1993:200-205

- (9) Domínguez JM, Flores CM, Díaz LJ, Camarena G. Desarrollo de adsorbentes de micotoxinas a base de tectosilicatos y filosilicatos microporosos. Memorias de la XXII Anual ANECA; 1997 mayo 7-11; Ixtapa, Zihuatanejo (Guerrero) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1997:311-315.
- (10) Muñoz J, Pérez R, Lara J. Capacidad de intercambio catiónico y adsorción de aflatoxina B1 en aluminosilicatos. Memorias de la XXII Convención Anual ANECA; 1997 mayo 7-11; Ixtapa, Zihuatanejo (Guerrero) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1997: 297-301.
- (11) Márquez MR, Vera GE, Hernández JK y Madrigal BE. Inhibición de la genotoxicidad de la aflatoxina B1 por la adición del aluminosilicato Bionit™ en un modelo *in vivo*. Memorias de la XXV Convención Anual ANECA; 2000 mayo 3-6; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2000: 169-171.
- (12) Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD, Corrier DE, Huff WE, Rottinghaus GE. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. Poultry Science 1990;78:204-210.

- (13) Edrington TS, Kubena LF, Harvey RB and Rottinghaus GE Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. Poultry Science 1997;76:1205-1211.
- (14) Bailey RH, Kubena LF, Harvey RB, Buckley SA and Rottinghaus GE Efficacy of various sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. Poultry Science 1998;77:1623-1630.
- (15) Huff WE, Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A Poultry Science 1992;71:64-69.
- (16) Dale N. Mycotoxin binders: It's time for real science. Poultry Digest 1998;57:38-39.
- (17) Devegowda G, Raju MVN, Afzali N and Swamy HVLN. Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. In: Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium. (Proceedings on CD-ROM) 1998.
- (18) Hoerr FJ, Carlton WW, Tuite J, Vesonder RF, Rohwedder WK and Szigeti G. Experimental thricothecene mycotoxicosis produced in broiler chickens by *Fusarium sporotrichiella* var. *sporotrichioides*. Avian Pathology 1982;11:385-405.
- (19) Rotter RG, Frohlich AA, Marquardt RR and Abramson D. Comparison of the effects of toxin-free and toxin containing mold contaminated barley on chick performance. Canadian Journal of Animal Science:69:247-259.
- (20) Ledoux DR and Rottinghaus GE. *In vitro* and *in vivo* testing of adsorbents for

- detoxifying mycotoxins in contaminated feedstuffs. In Lyons TP and Jacques KA, editors Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium. Nottingham:University Press, 1999:369-380.
- (21) Unión Nacional de Avicultores Avicultura Mexicana. UNA. Disponible en: <http://www.una.com.mx>
- (22) Unión Nacional de Avicultores Indicadores económicos. Producción industria avícola 2000. UNA. Disponible en: <http://www.una.com.mx>
- (23) Medina JC, Muñoz J, Castillo E, Romero M. Contaminación con zearalenona y deoxinivalenol en sorgo y alimentos balanceados en México. Memorias de la XVII Convención Anual ANECA: 1992; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1992.
- (24) Medina JC. Actualidades sobre micotoxinas. Los Avicultores y su entorno 2000;3:30-35.
- (25) Márquez MR, Madrigal SO, Madrigal BE, Villaruel VN, Vera GE y Tejada CI. Efecto antigenotóxico de los mananoligosacáridos (Mycosorb™) de *Saccharomyces cerevisiae* en dietas para ratón contaminadas con aflatoxina B1 (AFB1). Memorias de la XXV Convención Anual ANECA; 2000 mayo 3-6; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2000: 166-168.
- (26) Valladares JC. Efectos de las aflatoxinas en la morfofisiología del sistema inmunológico. Memorias de la IV jornada Médico Avícola; 1993 agosto 4-6 México

- (DF): Departamento de Producción Animal:Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1993: 250-257.
- (27) Diaz GJ, Squires EJ, Julian RJ and Boermans HJ. Individual and combined effects of T-2 toxin and DAS in laying hens. *British Poultry Science* 1994;35:393-405
- (28) Schaeffer JL, Tyczkowski JK and Hamilton PB. Alterations in carotenoid metabolism during ochratoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science* 1987;66:318-324
- (29) Coelho BM. Mycotoxin tolerance of animals. In: Coelho BM, editor. *Molds, mycotoxins and feed preservatives in the feed industry*. 2nd. ed, New Jersey: BASF Corporation, 1996, 27-30.
- (30) Marquardt RR and Frolich AA. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science* 1992;70:3968-3988
- (31) Elling F, Hald B, Jacobsen C and Krogh P. Spontaneous nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. *Acta of Pathology and Microbiology Scandinavian* 1975;83:739-742.
- (32) Hamilton PB, Huff WE, Harris JR and Wyatt RD. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poultry Science* 1982;61:1832-1841.
- (33) Burns RB, Dwivedi P. The natural occurrence of ochratoxin A and its effects on poultry. A review Part I. *Epidemiology and toxicity*. *World Poultry Science Journal* 1986;42:32-47

- (34) Burns RB, Dwivedi P. The natural occurrence of ochratoxin A and its effects on poultry. A review Part II Pathology and immunology. *World Poultry Science Journal* 1986;42:48-55
- (35) Glahn RP. Mycotoxins and the avian kidney: assessment of physiological function. *World's Poultry Science Journal* 1993;49:242-250
- (36) Trenk LH, Butz ME and Chu FS. Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. *Applied Microbiology* 1971;21:1032-1035.
- (37) Connole MD, Blaney BJ and McEwan T. Mycotoxins in animal feeds and toxic fungi in Queensland 1971-1980. *Australian Veterinary Journal* 1981;57:314-318
- (38) Samson RA, Hoekstra ES and Van Oorschot CAN. Introduction to food borne fungi. 2nd ed, Netherlands:Centraalbureau voor schimmelcultures, 1984.
- (39) Raper KB and Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Baltimore, USA:William & Wilkins, 1965.
- (40) Micco C, Miraglia M, Onori R, Ioppolo A and Mantovani A. Long-term administration of low doses of mycotoxins in poultry. 1. Residues of ochratoxin A in broilers and laying hens. *Poultry Science* 1987;66:47-50.
- (41) Fuchs R, Applegren LE, Hagelberg S and Hult K. Carbon-14-ochratoxin A distribution in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) monitored by whole body autoradiography. *Poultry Science* 1988;67:707-714.
- (42) Warren MF, Hamilton PB. Inhibition of the glycogen phosphorylase system during ochratoxicosis in chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 1980;40:522-525.

- (43) Sturkie PD. Kidneys, extrarenal salt excretion and urine. In: Sturkie PD. Avian physiology 4th ed, New York, USA:Springer-Verlag, 1986.
- (44) Chang CF, Huff WE and Hamilton PB. A leucocytopenia induced in chickens by dietary ochratoxin A. Poultry Science 1979;58:555-558.
- (45) Chang CF and Hamilton PB. Impairment of phagocytosis by heterophils from chickens during ochratoxicosis. Applied and Environmental Microbiology 1980;39:572-575.
- (46) Singh GSP, Chauhan HVS, Jha GJ and Singh KK. Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks. Journal of Comparative Pathology 1990;103:399-410
- (47) Dwivedi P and Burns RB. Pathology of ochratoxicosis A in young broiler chicks. Research in Veterinary Science 1984;36:92-103.
- (48) Doerr JA, Huff WE, Tung HT, Wyatt RD and Hamilton PB. A survey of T-2 toxin, ochratoxin and aflatoxin for their effects on the coagulation of blood in young broiler chickens. Poultry Science 1974;53:1728-1734.
- (49) Bailey CA, Gibson RM, Kubena LF, Huff WE and Harvey RB. Impact of L-Phenylalanine supplementation on the performance of three-week-old broilers fed diets containing ochratoxin A. 2. Effects on hematology and clinical chemistry. Poultry Science 1990;69:420-425.
- (50) Joffe AZ. *Fusarium* species. Their biology and toxicology. New York, USA:John Wiley and sons, 1986.
- (51) Ueno, Y. Toxicology of microbial toxins. Pure Applied Chemistry 1986;58:339-350.

- (52) Márquez MR, Tejada HI, González SD, Monroy BJI, Valero EG. Intoxicación por toxina 2 en aves de engorda. *Técnica Pecuaria México* 1995;33;112-115.
- (53) Ueno Y, Sawano M and Ishii K. Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture. *Applied Microbiology* 1975;30;4-9
- (54) Lillehoj EB. Feed sources and conditions conducive to production of aflatoxin, ochratoxin, *Fusarium* toxins and zearalenone. *J. Am. Vet. Med. Association* 1973;163:1281-1284.
- (55) Ueno Y. Toxicology of microbial toxins. *Pure applied chemistry* 1986;58;339-350
- (56) Chi MS, Robison TS, Mirocha CJ and Behrens JC. Transmission of radioactivity into eggs from laying hens (*Gallus domesticus*) administered tritium labeled T-2 toxin. *Poultry Science* 1978;57;1234-1238.
- (57) Karppanen E, Rizzo A, Saari L, Berg S and Bostrom H. Investigation on trichothecene-stimulated lipid peroxidation and toxic effects of trichothecenes in animal. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1989;30;391-399.
- (58) Coulombe RA. Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science* 1993;76;880-891
- (59) Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD, Corrier DE, Huff WE. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poultry Science* 1990;69;727-735.
- (60) Hoerr FJ, Carlton WW, Yagen B and Joffe AZ. Mycotoxicosis produced in broiler chickens by multiple doses of either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol. *Avian Pathology* 1982;11;369-383

- (61) Arce MJ, Avila GE, Vázquez PC, López CC, Tirado FJ. Efecto de dos aluminosilicatos en dietas con 45 ppb de aflatoxina B1 sobre los parámetros productivos en pollo de engorda *Veterinaria México* 1994;25:33-36
- (62) Kubena LF, Harvey RB, Bailey RH, Buckley SA and Rottinghaus GE. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science* 1998;77:1502-1509.
- (63) Ledoux DR, Rottinghaus GE, Bermudez AJ, Alonso-Debolt M. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science* 1999;78:204-210.
- (64) Phillips TD, Kubena LF, Harvey RB, Taylor DR, Heidelbaugh ND. Hydratal sodium calcium aluminosilicate: A high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Science* 1988;67:243-247.
- (65) Ramos AJ and Hernández E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. *Animal Feed Science and Technology* 1997;65:197-206.
- (66) Devegowda G. and Raju MVLN. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science* 2000;
- (67) Tamames F. Química de las arcillas. *Industria Avícola* 2000;47:20-22.
- (68) Flores CM, Domínguez JM, Díaz de León J. Modeling and experimental comparison on the differential adsorption of B1 and G1 aflatoxins on mineral

- aluminosilicates surfaces. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 1999;18:213-220
- (69) Lechuga GD, Rosiles MR, Horta RJM. Identificación fisicoquímica de algunos aluminosilicatos y de su actividad adsorbente sobre aflatoxina B₁ *in vitro*. *Veterinaria México* 1995;26:129-132.
- (70) Scheideler SE. Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin B1 on aflatoxin toxicity, chick performance and mineral status. *Poultry Science* 1993;72:282-288.
- (71) Madhyastha SM, Marquardt RR, Frohlich AA, Platford G and Abramson D. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *Journal of agricultural food and chemistry* 1990;38:1506-1510.
- (72) Stoloff L, Nesheim S, Yin L, Rodricks YV, Stack M and Campbell AD. A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxin, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1971;54:91-97
- (73) Nesheim S, Stack ME, Trucksess MW and Eppley M. Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in corn, barley, and kidney: collaborative study. *Journal of AOAC International* 1992;75:481-487.
- (74) Burmesteir HR. T-2 toxin production by *Fusarium tricinctum* on solid substrate. *Applied Microbiology* 1971;21:739-742.

- (75) Vesonder RF, Ciegler A and Jensen AH. Production of refusal factors by *Fusarium* strains on grains. Applied and environmental Microbiology 1977;34:105-106.
- (76) Perkin-Elmer. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Connecticut:Perkin-Elmer, 1994.
- (77) Association of Official Analytical Chemists. Official methods of the Association of Official Analytical Chemists. Edited by Kenneth Helrich. 15th. Ed. Washington DC:AOAC, 1990.
- (78) Tejada ZI. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. México:Sistema de Educación Continua en Producción Animal, Secretaría de Educación Pública, 1992.
- (79) Zaugg WS and Knox RJ. Indirect determination of inorganic phosphate by atomic absorption spectrophotometric determination of molybdenum. Analytical Chemistry 1966;38:1759-1760.
- (80) Hair JF, Anderson RE, Tatham RL and Black WC. Multivariate data analysis. 4th ed, New Jersey:Prentice Hall, 1995.
- (81) Osuna O. Soluciones prácticas para disminuir el impacto de las micotoxinas en la avicultura. Memorias del XVI Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura; 2000 Noviembre 15-17; Panamá (Panamá): Asociación Centroamericana de Avicultura, 2000:355-361.
- (82) Medina JC, Muñoz J, Lara J, Rivera L y Fierro JA. Criterios de control de calidad de aluminosilicatos comercializados como adsorbentes de micotoxinas. Memorias

- del XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura;1999 septiembre 21-24; Lima (Perú). Perú: Asociación Peruana de Avicultura, 1999: 391-393.
- (83) Dorner JW. Mycotoxins in food: Methods of analysis In: Nollet LM, editor. Handbook of food Analysis Volume 2. New York:Marcel Decker, 1996:1089-1146.
- (84) Andrade OF. Efecto de los aluminosilicatos como secuestrantes de aflatoxina B1, evaluado por conversión alimenticia y concentración de calcio, fósforo, magnesio, fierro, cobre y zinc en pollo de engorda (tesis de licenciatura). México (DF): FMVZ, UNAM, 1993.
- (85) Roland DA, Barnes DG and Laurent SM. Influence of sodium aluminosilicate, hydroxy-sodalite, carnegieite, aluminum sulfate and aluminum phosphate on performance of comercial Leghorns Poultry Science 1991;70:805-811
- (86) Huff WE, Wyatt RD, Tucker TL and Hamilton PB. Ochratoxicosis in the broiler chicken. Poultry Science 1974;53:1585-1591.
- (87) Kubena LF, Harvey RB, Huff WE and Corrier DE. Influence of ochratoxin A and T-2 toxin singly and in combination on broiler chickens. Poultry Science 1989;68:867-872.
- (88) Huff WE, Doerr JA, Wabeck CJ, Chaloupka GW, May JD and Merkley JW. The individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on various processing parameters of broiler chickens. Poultry Science 1984;63:2153-2161.
- (89) Kramer JW and Hoffmann WE. Clinical enzymology. In: Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML, editors. Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed, San Diego, California:Academis Press, 1997.

- (90) Ritchie BW, Harrison GJ and Harrison LR Avian medicine: principles and application. Florida, USA:Wingers publishing, 1994
- (91) Lumeij JT. Avian clinical biochemistry. In: Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML, editors. Clinical biochemistry of domestic animals 5th ed, San Diego, California:Academis Press, 1997
- (92) Kaneko JJ. Serum proteins and the dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML, editors. Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed, San Diego, California:Academis Press, 1997.
- (93) Smith TK. Recent advances in the understanding of *Fusarium* trichothecene mycotoxicoses. J. of Anim Sci. 1992;70:3989-3993.
- (94) Scott ML, Nesheim MC and Young RJ. Nutrition of the chicken. 3rd ed. Ithaca, New York:Scott and Associates, 1982
- (95) Petrone VM, Juárez RM, Tejeda R y García A. Hallazgos macroscópicos e histológicos gastrointestinales en pollos con mala pigmentación intoxicados con ocratoxina A. Memorias del X aniversario de la Sociedad Mexicana de Patólogos veterinarios: 2001 junio 14-17; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, AC, 2001.
- (96) Hoerr FJ. Liver. In: Riddell C, editor. Avian histopathology. 2nd ed., Canada:American Association of Avian pathologists, 1996.
- (97) Brown TP. Urinary system. In: Riddell C, editor. Avian histopathology. 2nd ed., Canada:American Association of Avian pathologists, 1996

- (98) Goodwin MA. Alimentary system. In: Riddell C, editor. Avian histopathology. 2nd ed., Canada:American Association of Avian pathologists, 1996.
- (99) Pope CR. Lymphoid system. In: Riddell C, editor. Avian histopathology. 2nd ed., Canada:American Association of Avian pathologists, 1996.

Anexo 1. Tablas de resultados

Cuadro 1. pH y porcentaje de Calcio, Sodio, Potasio, Aluminio y Silicio encontrados en diferentes aluminosilicatos comerciales

PRODUCTO	pH	Ca	Na	K	Al	Si
<i>Promisil</i>	9.6	0.15	0.60	0.27	4.70	26.86
<i>Zeotek</i>	8.3	0.02	0.54	0.74	5.81	20.87
<i>Mycoad</i>	8.4	0.07	0.41	0.81	5.81	37.76
<i>Klin sil</i>	9.6	0.37	0.52	1.05	3.10	24.75
<i>Neosil</i>	9	0.48	0.42	1.62	3.75	23.03
<i>Trisox</i>	9.3	0.30	0.83	0.69	4.97	25.77
<i>Trisox II</i>	8	0.08	1.09	0.74	4.54	33.76
<i>Aflatox</i>	8.2	0.56	0.54	1.82	5.08	31.66
<i>Comalit</i>	8.5	0.02	3.64	3.66	6.10	37.25
<i>Mycosorb</i>	5.6	-	-	-	-	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Resultados de adsorción de ocratoxina A por diferentes secuestrantes bajo diferentes métodos de extracción de OA no secuestrada.

Producto	Concentración promedio de OA (ppm) (Ensayo I)	% de adsorción Ensayo II	% de adsorción Ensayo III	% de adsorción Ensayo IV	Promedio
CONTROL	56.44	0.00	0.00	0.00	0.00
MYCOSORB	24.84	78.98	66.57	41.78	48.53
TRISOX	41.74	0.00	0.00	0.93	0.31
COMALIT	37.00	56.66	0.00	7.77	21.48
TRISOX II	56.14	30.36	54.36	10.07	31.60
ZEOTEK	68.13	93.07	98.36	63.31	84.91
KLINSIL	24.87	95.55	43.54	0.00	43.26
MYCOAD	26.34	80.05	62.73	43.18	61.99
AFLATOX	64.54	66.50	0.00	27.21	31.24
PROMISIL	57.17	63.43	0.00	19.31	27.58
NEOSIL 4	71.12	45.10	10.94	11.92	31.33

No hubo diferencia estadística $p > 0.05$

Cuadro 3. Porcentaje adsorción de OA y T-2 *in vitro* obtenidos mediante el método de ELISA

Promedios	% adsorción OA	% adsorción T-2
Testigo	0.00a	0.00a
Zeotek	100.00b	8.67b
Mycofix	37.95c	3.28ab
Cellic	5.78a	3.88ab

Valores con distinta literal indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Cuadro 4. Resultados promedio de peso corporal y consumo de alimento en pollos de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según efecto de secuestrante

	<i>Sin secuestrante</i>	<i>Zeotek</i>	<i>Mycofix</i>
Peso ganado (g)	557.04 ± 20.33a	560.86 ± 20.6a	562.30 ± 25.03a
Consumo de alimento (g)	783.29 ± 22.19a	795.45 ± 23.16a	806.27 ± 27.62a

Valores con distinta literal indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Valores promedio ± Error estándar de la media

Cuadro 5. Resultados promedio de peso corporal y consumo de alimento en pollos de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según efecto de micotoxina

	<i>Sin Micotoxina</i>	<i>Ocratoxina A</i>	<i>Toxina T-2</i>	<i>Ocratoxina A/ T-2</i>
Peso ganado (g)	665.5 ± 6.66a	513.56 ± 8.02b	594.40 ± 16.94c	466.80 ± 12.69d
Consumo de alimento (g)	900.55 ± 9.3a	767.07 ± 12.21b	826.61 ± 23.28c	685.78 ± 15.93d

Valores con distinta literal indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Valores promedio ± Error estándar de la media

Cuadro 6. Cuadro de análisis de varianza del comportamiento productivo (peso ganado y consumo de alimento)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Significancia
Modelo corregido	45.844	13	3.526	16.176	.000
Intercepto	1.733 E-02	1	1.733 E-02	0.079	.779
Secuestrantes	0.423	3	0.141	0.646	0.59
Ocratoxina A (OA)	30.829	1	30.829	141.410	0.000
Toxina T-2	7.315	1	7.315	33.553	0.000
Secuestrantes+OA	1.276	2	0.638	2.928	0.065
Secuestrantes+T-2	0.313	2	0.157	0.719	0.493
OA+T-2	3.397 E-02	1	3.397 E-02	0.156	0.695
Secuestrante+OA+T-2	1.678	2	0.839	3.849	0.029
Error	9.156	42	0.218		
Total	55	56			
Total corregido	55	55			

Cuadro 7. Resultados promedio de peso corporal y consumo de alimento en pollos de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según tratamientos

Tratamiento	Peso ganado	Consumo de alimento
Testigo	665 ± 4.7	905 ± 18.79
Zeotek	669.25 ± 10.2	898.67 ± 22.11
Mycofix	662.25 ± 18.81	898 ± 9.97
OA	509.38 ± 16.52	745.63 ± 21.86
T-2	567.33 ± 31.03	768.91 ± 36.13
OA+T-2	486.46 ± 25.91	713.62 ± 24.87
OA+Zeotek	530.75 ± 6.95	779.35 ± 21.49
OA+Mycof	500.58 ± 15.02	776.25 ± 21.7
T-2+Zeotek	574.50 ± 27.19	820.05 ± 31.31
T-2+Mycofix	641.38 ± 18.53	890.88 ± 34.29
OA+T-2+Zeo	507.92 ± 22.38	683.75 ± 28.38
OA+T-2+Myc	445 ± 17.6	659.97 ± 29.76
OA+Celtic	520 ± 20.43	740 ± 31.62
T-2+Celtic	636.25 ± 13.6	870 ± 17.32

• Media ± Error Estándar

Cuadro 8. Resultados promedio de los valores plasmáticos evaluados en pollos de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según efecto de secuestrante

	AST (UI/L)	PT (g/L)	ALB (g/L)	GLOB (g/L)	AC. URICO(μmol/L)
SIN SECUESTRANTE	287.65 ± 11.54a	23.1 ± 0.73a	9.5 ± 0.38a	13.6 ± 0.41a	963.1 ± 161.43a
ZEOTEK	267.05 ± 10.41a	22.47 ± 1.32a	8.74 ± 0.52a	13.74 ± 0.93a	791.89 ± 125.54a
MYCOFIX	247.7 ± 10.93b	21.7 ± 1.01a	8.2 ± 0.39b	13.5 ± 0.70a	582.65 ± 93.88a
CELTIC	229.1 ± 7.69b	23.7 ± 0.74a	8.9 ± 0.37a	14.8 ± 0.65a	490.9 ± 55.64a

Valores con diferente literal indican diferencia significativa (p<0.05)

- Media ± Error Estándar

Cuadro 9. Resultados promedio de los valores plasmáticos evaluados en pollos de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según efecto de micotoxina

	AST (UI/L)	PT (g/L)	ALB (g/L)	GLOB (g/L)	AC. URICO(μmol/L)
Sin micotoxina	279.26 ± 11.55a	26.53 ± 0.6a	10.67 ± 0.25a	15.87 ± 0.5a	628.8 ± 83.21a
Ocratoxina	277.8 ± 12.52a	21.90 ± 1.08b	8 ± 0.37b	13.9 ± 0.85b	1086.75 ± 191.77b
T-2	243 ± 8.13b	23.55 ± 0.72b	9.5 ± 0.29b	14.05 ± 0.64b	397.95 ± 36.31
OA / T-2	247.64 ± 14.31b	18.07 ± 0.9b	7.07 ± 0.48b	11 ± 0.49b	838.85 ± 140.68b

Valores con diferente literal indican diferencia significativa (p<0.05)

- Media ± Error Estándar

Cuadro 10. Resultados promedio de los valores plasmáticos evaluados en pollos de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según combinaciones de tratamientos

	AST (UI/L)	PT (g/L)	ALB (g/L)	GLOB (g/L)	AC. URICO (μmol/L)
Testigo	274.2 ± 29.06	25.4 ± 0.75	10.4 ± 0.24	15 ± 0.84	713.8 ± 128.66
Zeotek	299 ± 7.31	28.2 ± 1.01	11.4 ± 0.4	16.8 ± 0.96	791.4 ± 144.32
Mycofix	264.6 ± 18.61	26 ± 1.04	10.2 ± 0.49	15.8 ± 0.73	381.2 ± 107.61
OA	316 ± 23.38	21.2 ± 1.35	8.4 ± 0.67	12.8 ± 0.73	1940.2 ± 287.51
T-2	284.4 ± 10.88	24.8 ± 1.07	10.6 ± 0.51	14.2 ± 0.66	437 ± 76.55
OA+T-2	276 ± 27.15	21 ± 1.58	8.6 ± 0.98	12.4 ± 0.67	761.4 ± 237.68
OA+Zeotek	290.8 ± 24.79	19.8 ± 1.85	7.6 ± 0.92	12.2 ± 0.97	1019 ± 316.84
OA+Mycof	257.2 ± 26.77	22.8 ± 2.26	8.2 ± 0.37	14.6 ± 1.96	780.4 ± 249.55
T-2+Zeotek	239.2 ± 11.34	24.6 ± 2.11	9 ± 0.45	15.6 ± 2.23	468.6 ± 89.52
T-2+Mycofix	237.4 ± 17.21	21.2 ± 1.11	8.4 ± 0.51	12.8 ± 0.97	311.8 ± 32.34
OA+T-2+Zeo	232.25 ± 17.23	16 ± 1.26	6.5 ± 0.58	9.5 ± 0.77	912.75 ± 362.07
OA+T-2+Myc	231.6 ± 26.91	16.8 ± 0.86	6 ± 0.32	10.8 ± 0.66	857.2 ± 188.3
OA+Celltic	247.2 ± 18.78	23.8 ± 1.96	7.8 ± 0.66	16 ± 1.64	607.4 ± 120.7
T-2+Celltic	211 ± 4	23.6 ± 1.03	10 ± 0.44	13.6 ± 0.6	374.4 ± 80.63

• Media ± Error Estándar

Cuadro 11. Cuadro de análisis de varianza multivariado para los valores de bioquímica sanguínea en pollos de 21 días.

Efecto	Estadístico de prueba	Valor del estadístico	Valor de F	Grados de libertad	Grados de libertad del error	Significancia
Intercepto	Traza de Pillai	1	74373	5	59	0.000
Secuestrantes	Traza de Pillai	0.493	2.399	15	183	0.003
OA	Traza de Pillai	0.512	12.373	5	59	0.000
T-2	Traza de Pillai	0.385	7.376	5	59	0.000

Fuente de Variación	Variable dependiente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Significancia
Modelo corregido	AST	0.149	5	2.984 e-02	4.775	0.001
	PT	1760.093	5	352.019	9.813	0.000
	ALB	840.399	5	168.08	14.804	0.000
	GLOB	1.054	5	0.211	6.556	0.000
	AC. URICO	4.964	5	0.993	6.499	0.000
Intercepto	AST	947.638	1	947.638	145940.8	0.000
	PT	68461.62	1	68461.62	2076.301	0.000
	ALB	14606.072	1	14606.072	1413.194	0.000
	GLOB	417.278	1	417.278	14256.622	0.000

	AC. URICO	1711.054	1	1711.054	11764.907	0.000
Secuestrante	AST	9.202e-02	3	3.067e-02	4.724	0.005
	PT	96.728	3	32.243	.978	.41
	ALB	113.031	3	37.677	3.645	0.018
	GLOB	6.313e-02	3	2.104e-02	.719	.545
	AC. URICO	1.408	3	.469	3.226	0.029
OA	AST	1.97e-04	1	1.97e-04	.03	.862
	PT	1319.771	1	1319.771	40.026	0.000
	ALB	551.743	1	551.743	53.383	0.000
	GLOB	.738	1	.738	25.199	0.000
	AC. URICO	2.431	1	2.431	16.715	0.000
T-2	AST	4.941e-02	1	4.941e-02	7.61	0.008
	PT	449.26	1	449.26	13.625	0.001
	ALB	127.96	1	127.96	12.381	0.001
	GLOB	.342	1	.342	11.687	0.001
	AC. URICO	.862	1	.862	5.926	0.018
Secuest *OA	AST	6.545e-03	2	3.273e-03	.504	0.607
	PT	209.048	2	104.524	3.17	0.05
	ALB	22.02	2	11.01	1.065	0.352
	GLOB	0.206	2	0.103	3.52	0.036
	AC. URICO	0.412	2	0.206	1.416	0.251
Secuest * T-2	AST	1.845e-02	2	9.226e-03	1.421	0.25
	PT	198.074	2	99.037	3.004	0.058
	ALB	94.912	2	47.456	4.592	0.014
	GLOB	0.104	2	5.19e-02	1.773	0.179
	AC. URICO	0.812	2	0.406	2.793	0.07
OA*T-2	AST	3.553E-03	1	3.553E-03	0.547	0.463
	PT	0.598	1	0.598	0.018	0.893
	ALB	4.627	1	4.627	0.461	0.5
	GLOB	1.358E-02	1	1.358E-02	0.464	0.499
	AC. URICO	1.349E-03	1	1.349E-03	0.009	0.924
SEC*OA*T-2	AST	7.69E-03	2	3.845E-03	0.592	0.557
	PT	4.627	2	2.314	0.07	0.932
	ALB	12.867	2	6.434	0.622	0.54
	GLOB	1.661E-02	2	8.306E-03	0.284	0.754
	AC. URICO	.226	2	0.113	0.778	0.464
Error	AST	0.357	55	6.493E-03		
	PT	1813.508	55	32.973		
	ALB	568.453	55	10.336		
	GLOB	1.61	55	2.927E-02		
	AC. URICO	7.999	55	0.145		
Total	AST	1043.657	69			
	PT	79001.842	69			
	ALB	17598.716	69			
	GLOB	460.46	69			
	AC. URICO	1903.585	69			

Cuadro 12. Promedio de pesos relativos/100 g de peso en pollos de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según efecto de secuestrante

	Hígado	Riñón	Bolsa
Sin secuestrante	2.834	0.615	0.218
Zeotek	2.930	0.568	0.220
Mycifix	2.857	0.558	0.230
Celtic	3.019	0.549	0.234

No hubo diferencia estadística $P > 0.05$

Cuadro 13. Promedio de pesos relativos/100 g de peso en pollos de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según efecto de micotoxina

	Hígado	Riñón	Bolsa
Sin micotoxina	2.830a	0.418a	0.194a
OA	2.912a	0.679b	0.216a
T-2	2.990a	0.445b	0.220b
OA/T-2	2.785a	0.769c	0.273c

Valores con distinta literal indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Cuadro 14. Promedio de pesos relativos/100 g de peso en pollos de engorda de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según combinaciones de tratamientos

	Hígado	Riñón	Bolsa
Testigo	2.681	0.413	0.222
Zeotek	3.120	0.430	0.199
Mycofix	2.690	0.414	0.162
OA	3.023	0.863	0.223
T-2	2.771	0.433	0.187
OA+T-2	2.863	0.752	0.242
OA+Zeotek	2.849	0.669	0.220
OA+Mycof	2.775	0.574	0.222
T-2+Zeotek	2.928	0.406	0.180
T-2+Mycofix	3.228	0.456	0.247
OA+T-2+Zeo	2.825	0.767	0.283
OA+T-2+Myc	2.737	0.788	0.291
OA+Celtic	3.004	0.613	0.200
T-2+Celtic	3.035	0.485	0.269

Cuadro 15. Resultados promedio de lesiones histopatológicas observadas en diferentes órganos de pollos de engorda de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según de secuestrante

		Sin secuestrante	Zeotek	Mycofix	Celtic
RIÑÓN	Células en apoptosis/necrosis	16.94a	15.57a	14.08a	13.21a
	Porcentaje de glomérulo/ovillo	76.54a	79.85a	78.83a	81.82a
PROVENTRÍCULO	Diámetro glándula	131.77a	156.51b	139.30a	147.13b
	Proporción glándula/conducto	20.8a	24.37a	20.48a	22.51a
	Grosor del epitelio de revestimiento	25.31a	26.35a	23.43b	24.20a
HIGADO	% células tumefactas	56.44a	46.93a	53.38a	57.59a
	% células necróticas	7.46a	10.55a	6.69a	6.12a
	% Tejido de reparación	19.54a	16.52a	13.86a	9.62a
	Conductos biliares/espacio porta	2.48a	2.39a	2.54a	2.66a
BOLSA DE FABRICIO	% tejido linfoide lesionado	31.20a	33.73a	47.25a	25.67a

Valores con diferente literal en renglón indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Cuadro 16. Resultados promedio de lesiones histopatológicas observadas en diferentes órganos de pollos de engorda de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según efecto de micotoxina.

		Sin micotoxina	OA	T-2	OAT-2
RIÑÓN	Células en apoptosis/ necrosis	12.06a	18.52b	10.95a	19.57b
	Porcentaje de glomérulo/ ovillo	77.23a	78.06a	81.41a	78.33a
PROVENTRÍCULO	Diámetro glándula	149.51a	145.21a	137.92a	141.16a
	Proporción glándula/ conducto	20.04a	22.14a	21.23a	24.81a
	Grosor del epitelio de revestimiento	24.65a	25.36a	25.95a	23.18a
HIGADO	% células tumefactas	34.23a	74.41b	46.57a	51.74ab
	% células necróticas	4.71a	9.90b	7.01a	9.97b
	% Tejido de reparación	5.41a	20.42b	8.61a	29.93c
	Conductos biliares/ espacio porta	2.18a	2.51a	2.68b	2.56ab
BOLSA DE FABRICIO	% tejido linfoide lesionado	27.14a	45.90a	36.12a	30.19a

Valores con diferente literal en los renglones indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Cuadro 17 Resultados promedio de lesiones histopatológicas en hígado y bolsa de Fabricio de pollos de engorda de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según combinaciones de tratamientos

	HIGADO				BOLSA DE FABRICIO
	% células tumefactas	% Células necróticas	% Tejido de reparación	Conductos biliares/ espacio porta	% tejido linfóide lesionado
Testigo	17.94	3.5	4.76	2.1	29.08
Zeotek	41.5	5.58	5.16	2.1	22.33
Mycofix	43.24	5.06	6.32	2.3	30.00
OA	78.94	12.5	38.7	2.8	35.25
T-2	56.4	3.8	6.48	2.4	33.13
OA+T-2	72.46	10.02	28.2	2.6	27.33
OA+Zeotek	67.62	10.46	20.72	2.4	54.33
OA+Mycof	79.5	9.28	10.36	2.4	64.00
T-2+Zeotek	43.38	13.32	10.98	2.8	30.33
T-2+Mycofix	42.9	6.02	9.6	2.7	59.67
OA+T-2+Zeo	35.2	12.82	29.2	2.3	27.92
OA+T-2+Myc	46.5	6.35	33	2.8	35.33
OA+Celtic	71.58	7.36	11.88	2.5	30.00
T-2+Celtic	43.6	4.88	7.36	2.8	21.33

Cuadro 18. Resultados promedio de lesiones histopatológicas en riñón y proventrículo de pollos de engorda de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según combinaciones de tratamientos

	RIÑÓN		PROVENTRÍCULO		
	Células en apoptosis/necrosis	Proporción glomérulo/ovillo	Diámetro Glándula	Porcentaje de conducto	Grosor de epitelio
Testigo	11.109	76.974	127.655	18.589	25.000
Zeotek	11.711	77.920	180.215	21.334	27.900
Mycofix	13.358	76.792	140.653	20.185	21.050
OA	28.187	75.696	138.135	18.885	24.233
T-2	10.141	77.557	128.851	19.148	26.550
OA+T-2	18.330	75.928	132.424	26.917	25.450
OA+Zeotek	19.154	79.321	151.393	26.811	25.450
OA+Mycof	11.321	75.338	143.199	19.325	27.500
T-2+Zeotek	11.494	83.355	135.884	21.883	27.900
T-2+Mycofix	11.196	82.946	140.821	22.374	25.200
OA+T-2+Zeo	19.926	78.810	158.545	27.470	24.150
OA+T-2+Myc	20.440	80.257	132.508	20.045	19.950
OA+Celtic	15.430	81.877	148.122	23.526	24.250
T-2+Celtic	10.980	81.769	146.139	21.496	24.150

Cuadro 19. Porcentaje promedio de calcio y fósforo en hueso de de pollos de engorda de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según efecto de secuestrante

	% fósforo en hueso	% Calcio en hueso
Sin secuestrante	13.97	12.90
Zeotek	14.03	12.52
Mycofix	14.02	12.90
Celtic	14.01	13.16

No se encontró diferencia estadística $p > 0.05$

Cuadro 20. Porcentaje promedio de calcio y fósforo en hueso de de pollos de engorda de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según efecto de micotoxina

	% fósforo en hueso	% Calcio en hueso
<i>Sin micotoxina</i>	13.97a	12.23a
OA	14.04a	12.81a
T-2	13.96a	13.04a
OA/T-2	14.06a	13.15a

No se encontró diferencia estadística $p > 0.05$

Cuadro 21. Valores promedio de calcio y fósforo en hueso de de pollos de engorda de 21 días alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con secuestrantes, según combinaciones de tratamientos

	% fósforo en hueso	% Calcio en hueso
<i>Testigo</i>	13.934	12.706
<i>Zeotek</i>	13.968	12.251
<i>Mycifix</i>	14.002	11.817
OA	13.945	12.677
T-2	13.871	13.626
OA+T-2	14.119	12.541
OA+Zeotek	14.187	12.541
OA+Mycof	13.898	13.218
T-2+Zeotek	14.006	11.710
T-2+Mycifix	14.050	13.120
OA+T-2+Zeo	13.945	13.409
OA+T-2+Myc	14.113	13.514
OA+Cellic	14.099	12.870
T-2+Cellic	13.928	13.449

ANEXO 2. FIGURAS

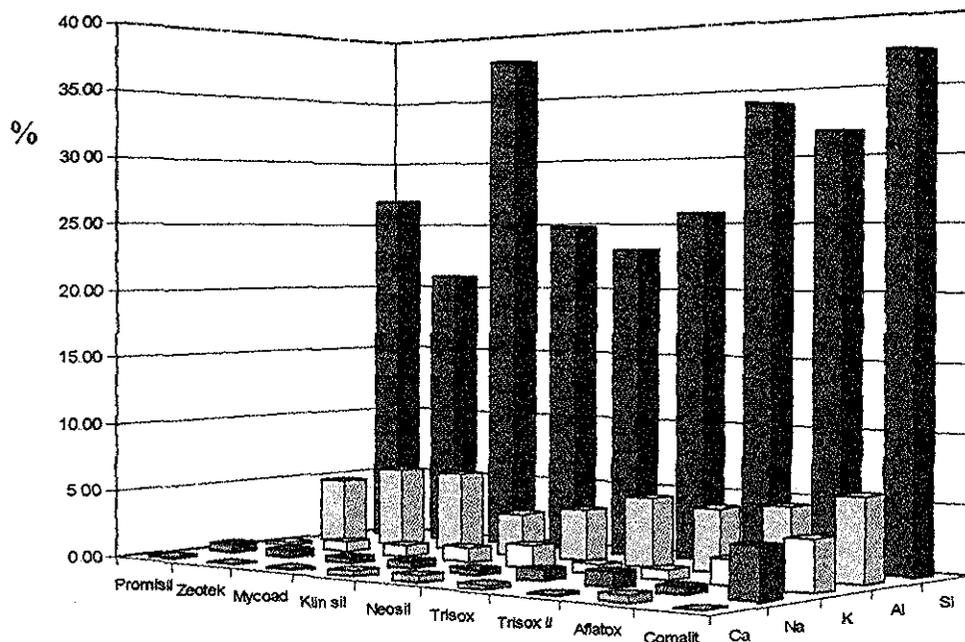


Figura 1: Porcentaje de Ca, Na, K, Al y Si de diferentes aluminosilicatos comerciales

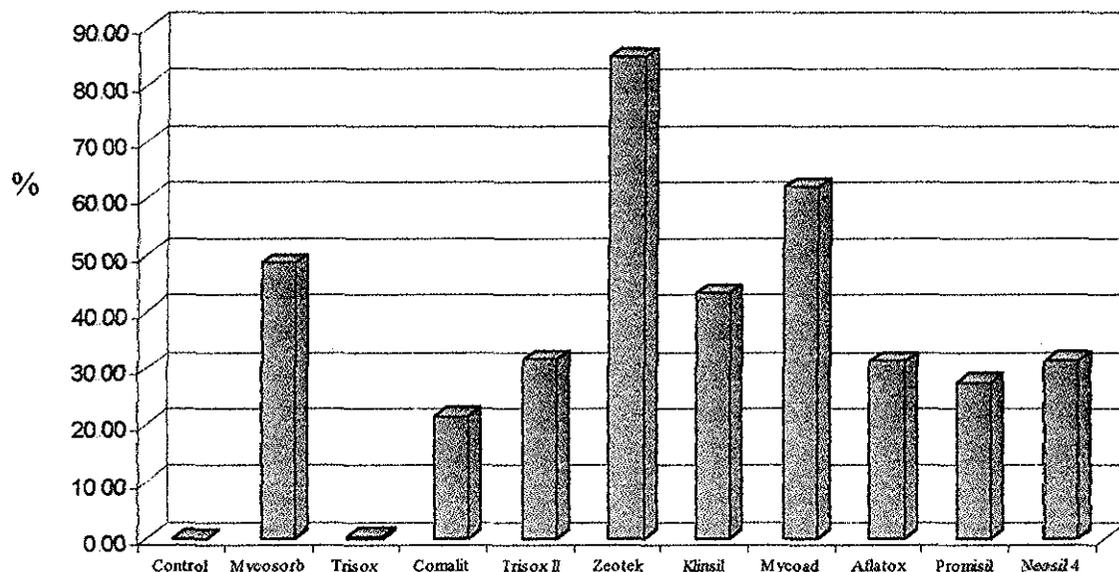


Figura 2: Porcentaje promedio de secuestro *in vitro* de ocratoxina A por diferentes secuestrantes de micotoxinas

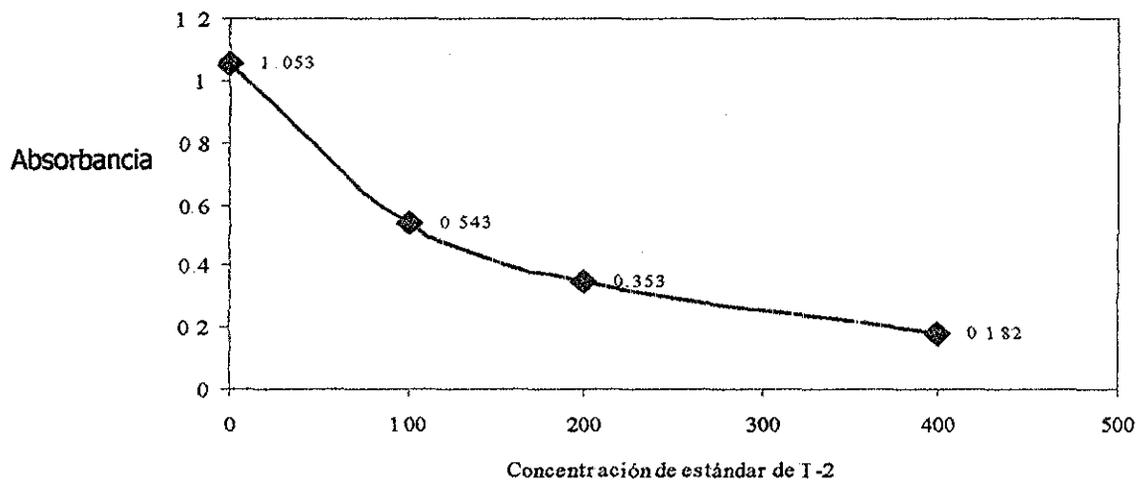


Figura 3. Curva estándar de toxina T-2 para la prueba de ELISA

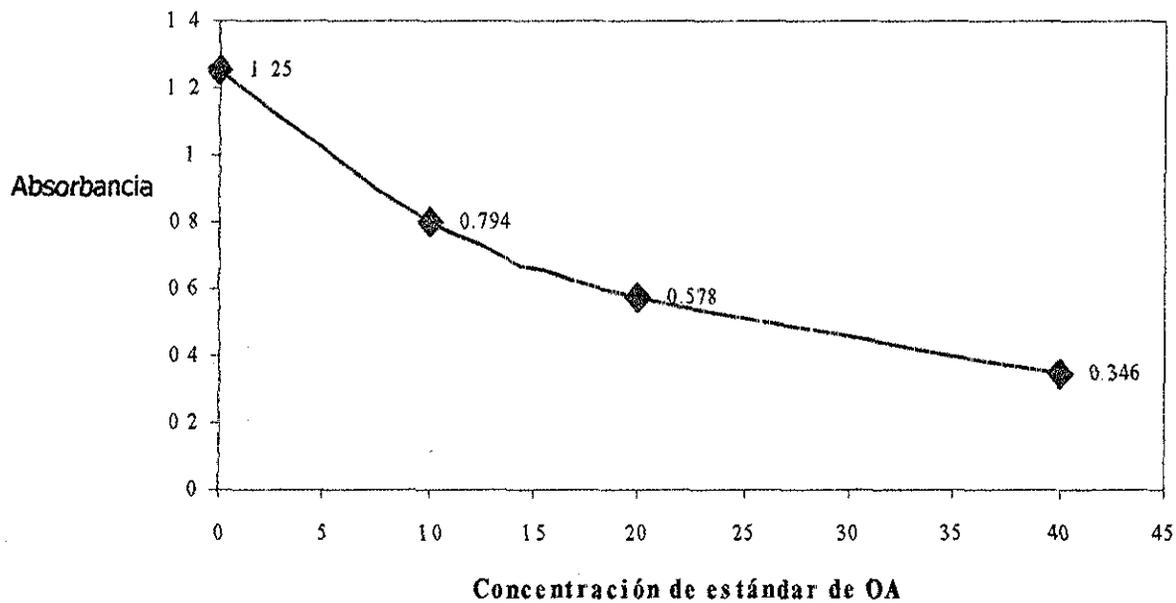


Figura 4. Curva estándar de ocratoxina A para la prueba de ELISA

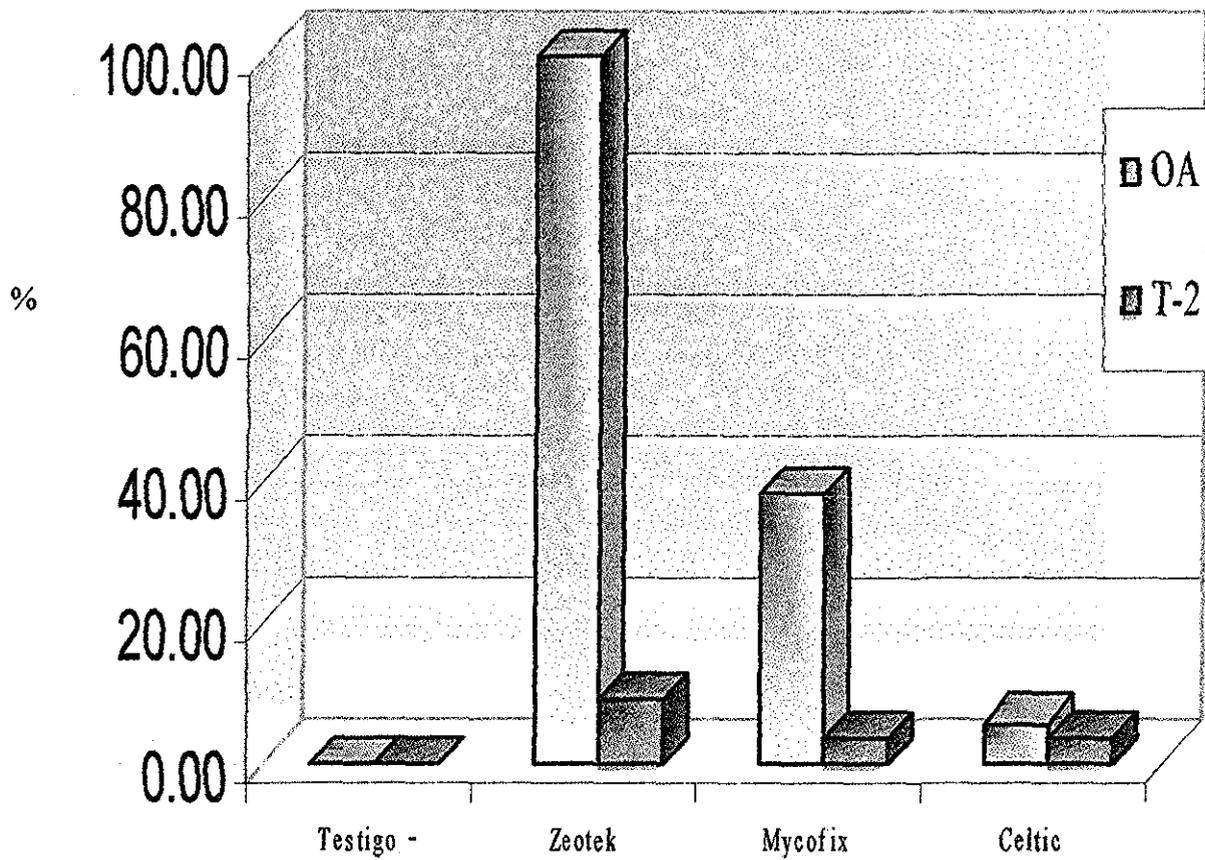


Figura 5. Porcentaje de secuestro *in vitro* de ocratoxina A y toxina T-2 por diferentes secuestrantes

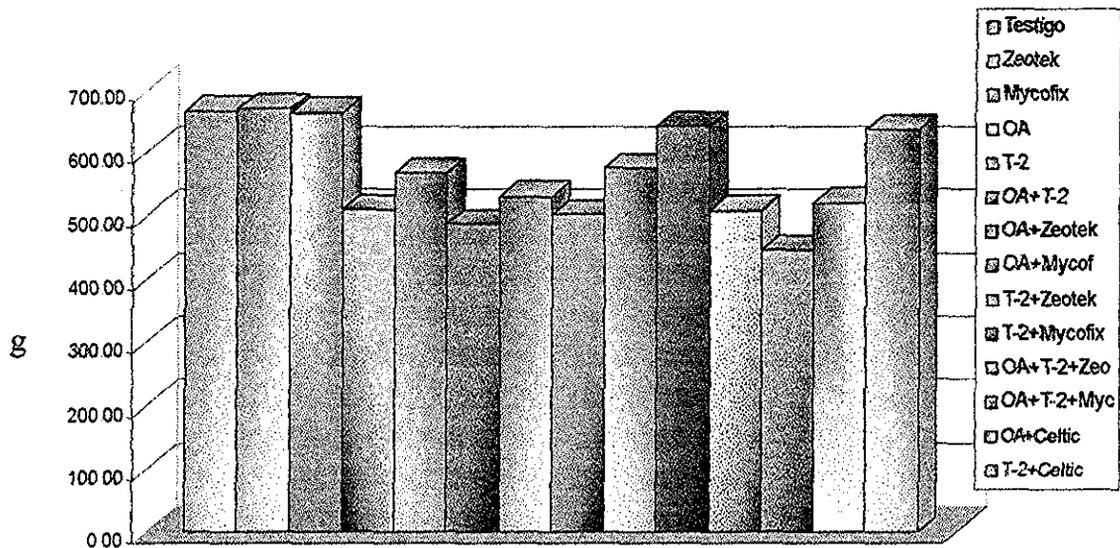


Figura 6. Ganancia promedio de peso de 0-21 días de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con pollos tratados con micotoxinas y secuestrantes

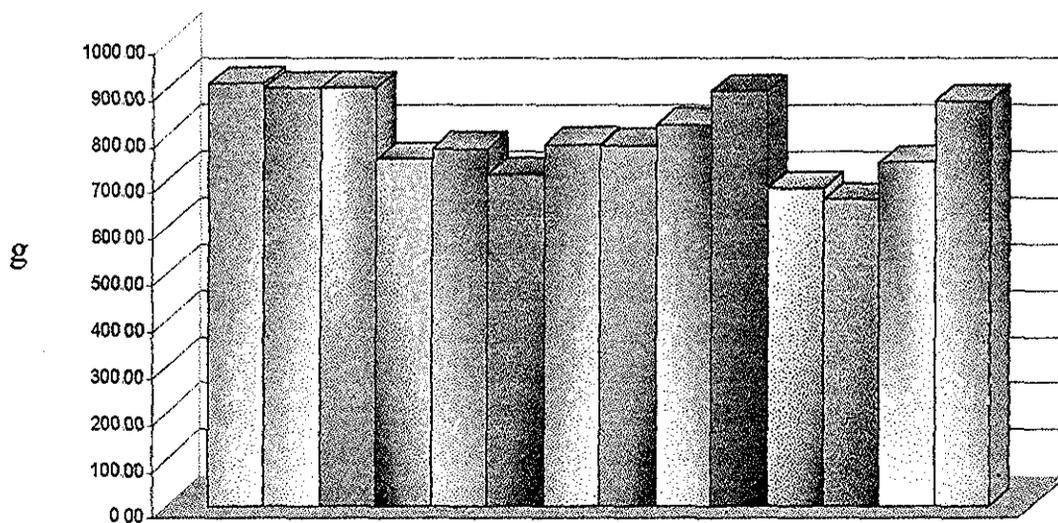


Figura 7. Consumo de alimento acumulado (0-21 días) de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

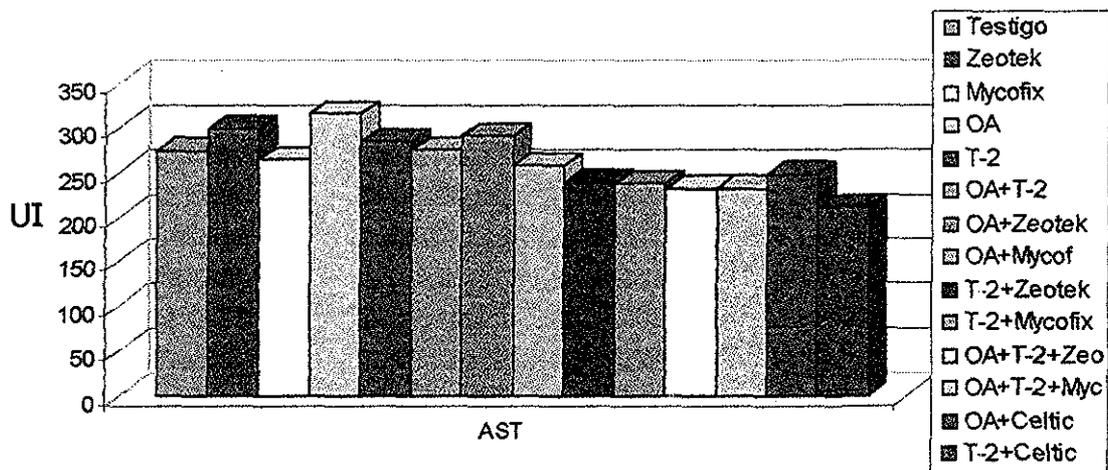


Figura 8. Valores de AST (UI/L) en plasma de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y sequestrantes

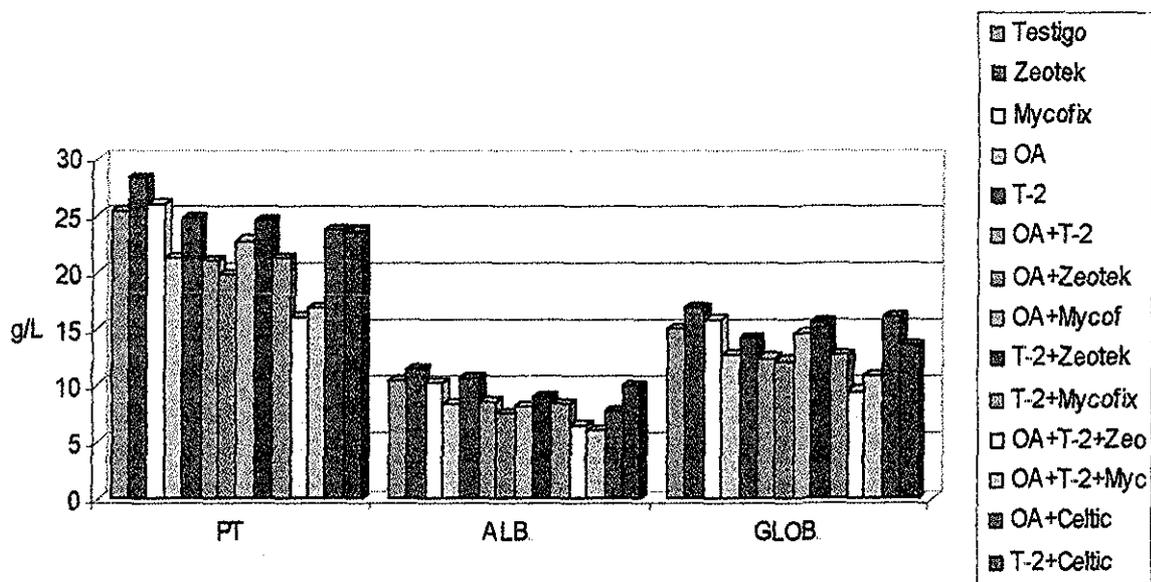


Figura 9. Concentraciones de Proteínas totales, albúmina y globulinas en plasma de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y sequestrantes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

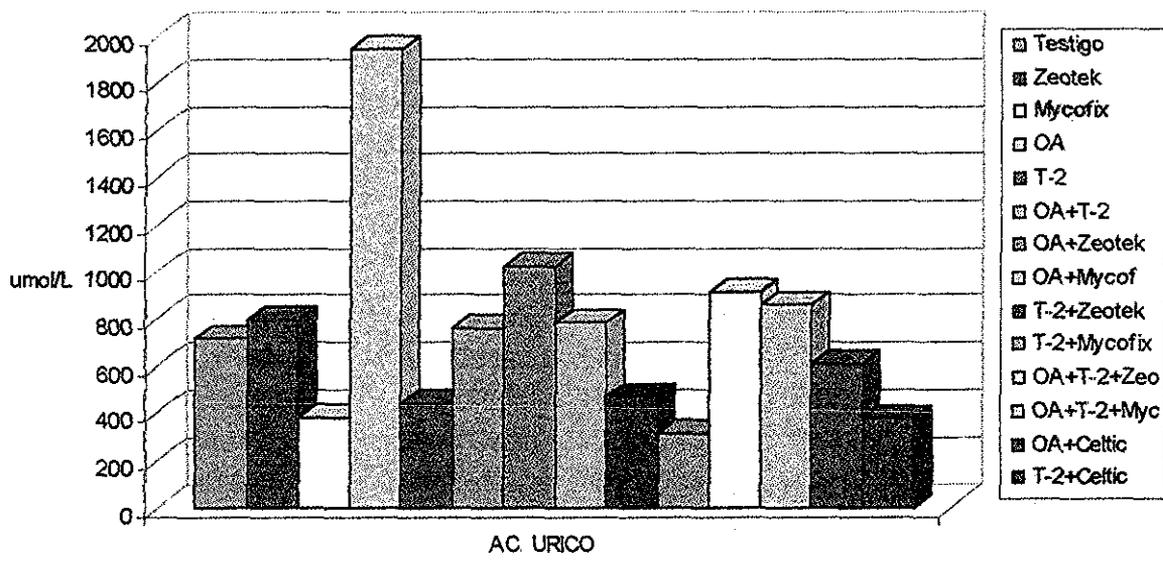


Figura 10. Valores de ácido úrico en plasma de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

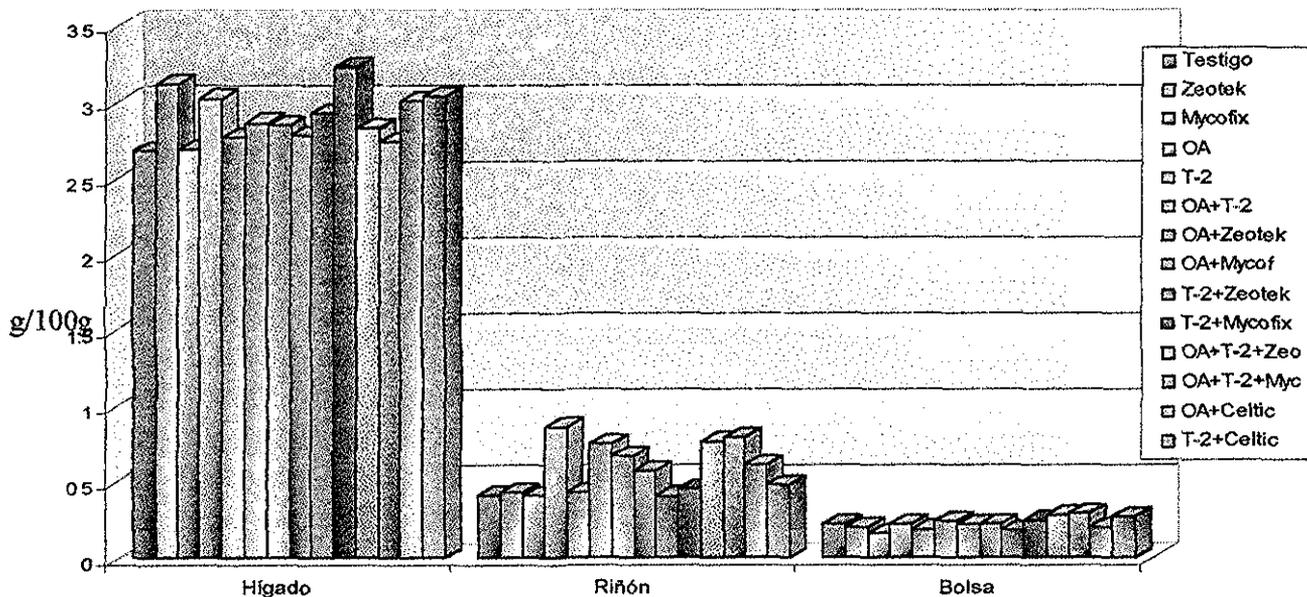


Figura 11. Pesos relativos de hígado, riñón y bolsa de Fabricio /100 gr de tejido en pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

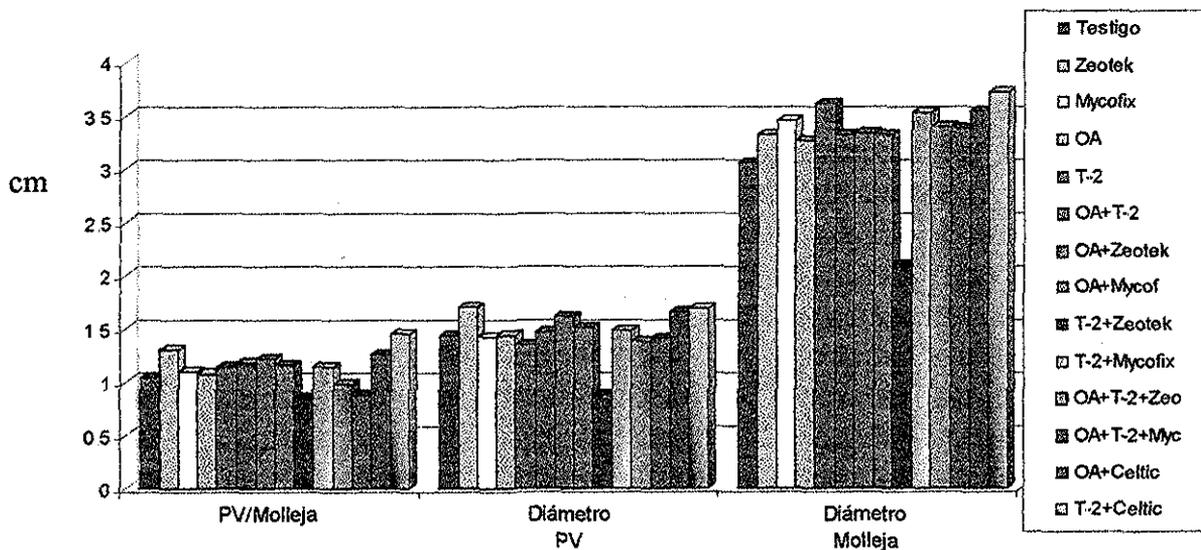


Figura 12. Diámetros (en cm) de la unión proventriculo/molleja, proventriculo y molleja de de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

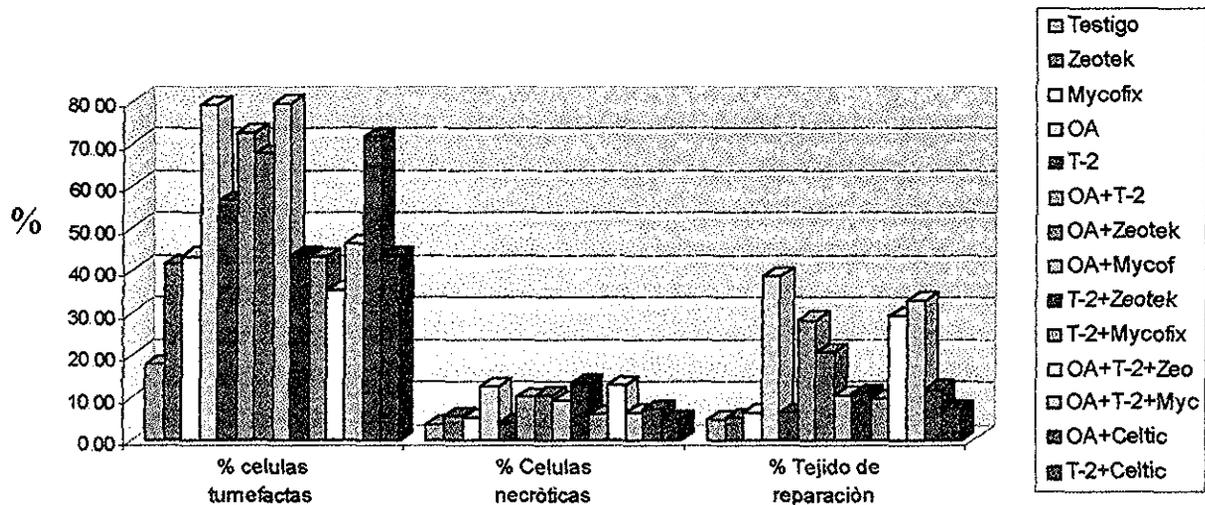


Figura 13 Evaluación histopatológica de hígado (I) Porcentaje de hepatocitos tumefactos, necróticos y tejido de reparación de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

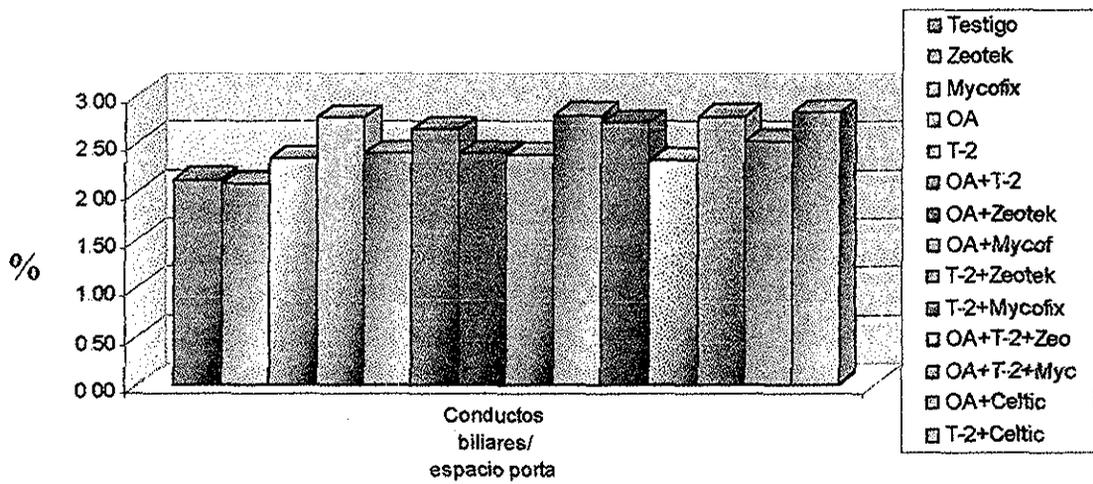


Figura 14. Evaluación histopatológica de hígado (II) Número de conductos biliares por espacio porta en pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

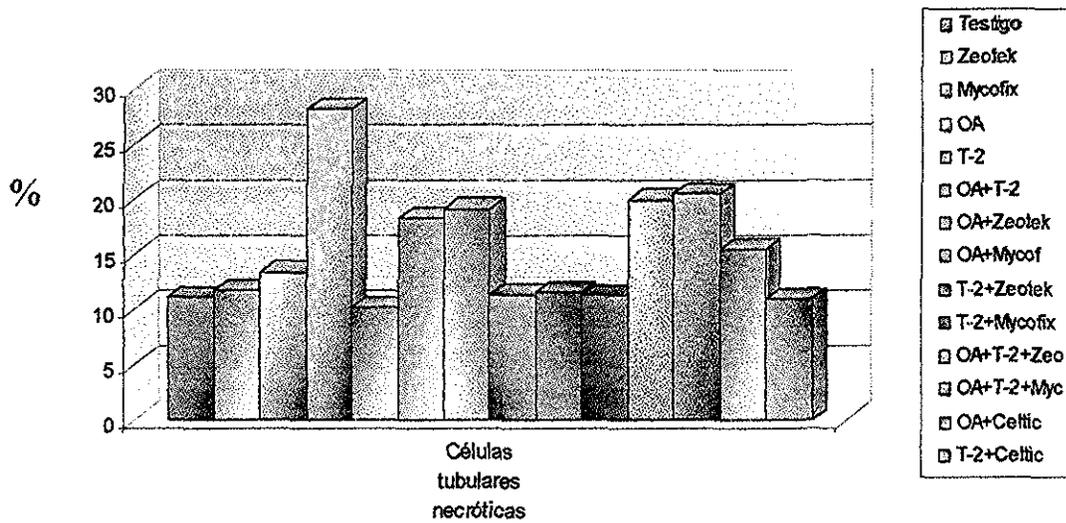


Figura 15. Evaluación histológica de riñón (I) Porcentaje de células tubulares necróticas en pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con pollos tratados con micotoxinas y secuestrantes

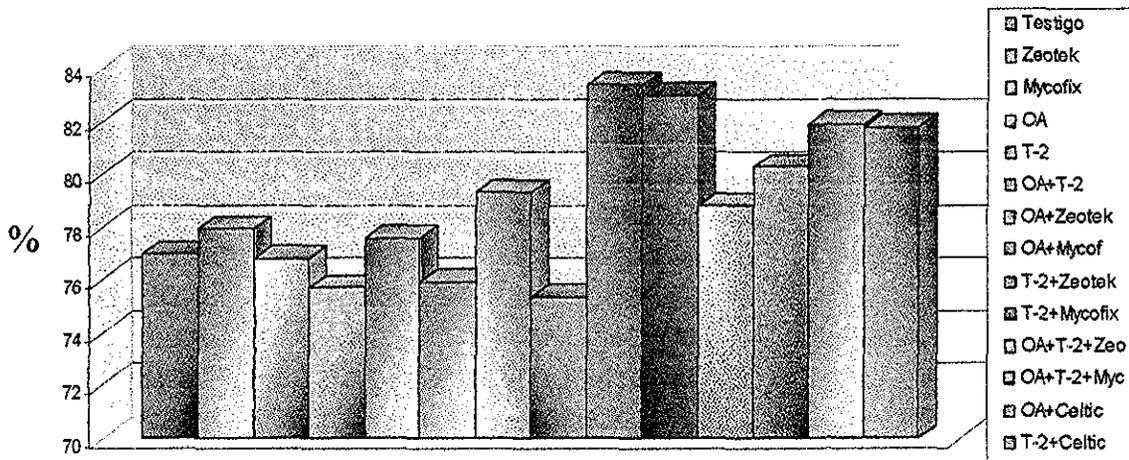


Figura 16. Evaluación histológica de riñón (II). Porcentaje de glomérulo ocupado por el ovillo en riñón de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

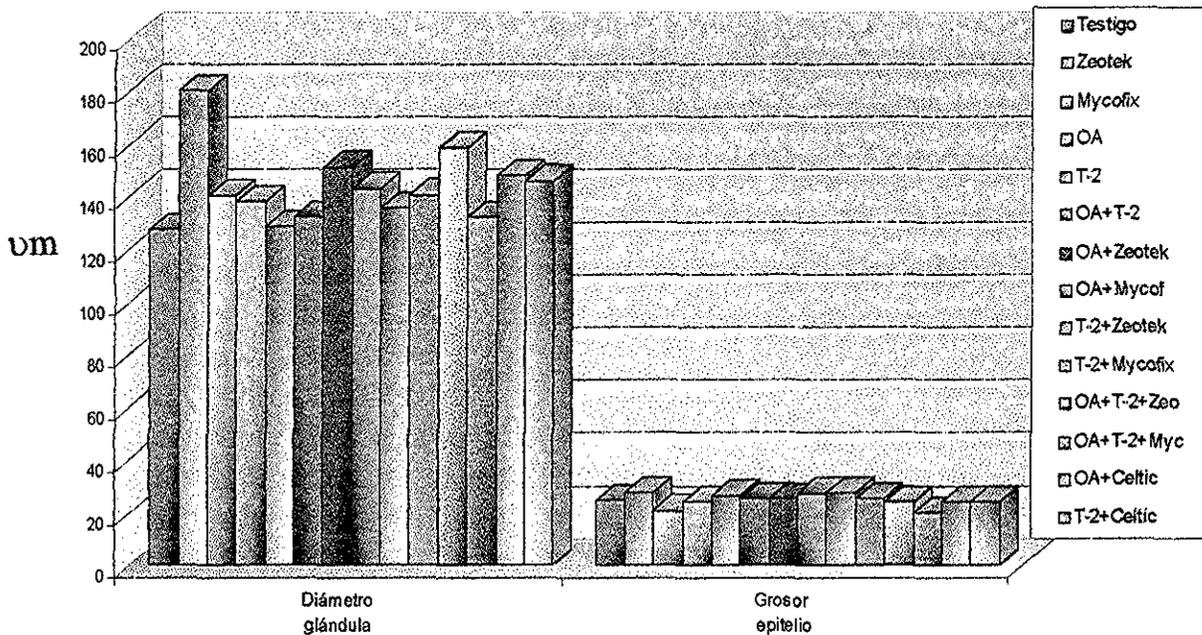


Figura 17. Evaluación histológica de proventrículo (I) Diámetro (en micras) de las glándulas proventriculares y grosor del epitelio de revestimiento (en micras) de proventrículo de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

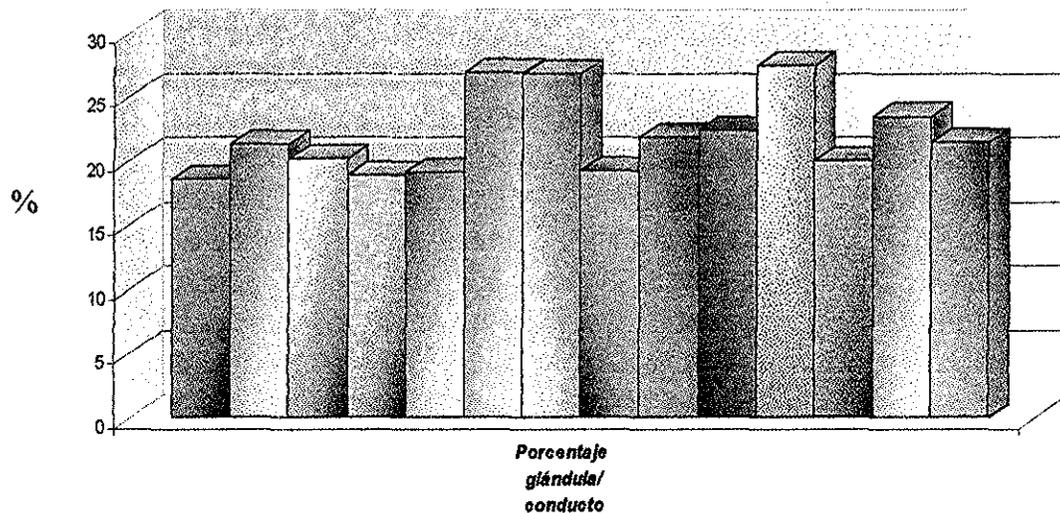


Figura 18. Evaluación histológica de Proventriculo (II). Porcentaje de glándula ocupada por el conducto en proventriculo de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

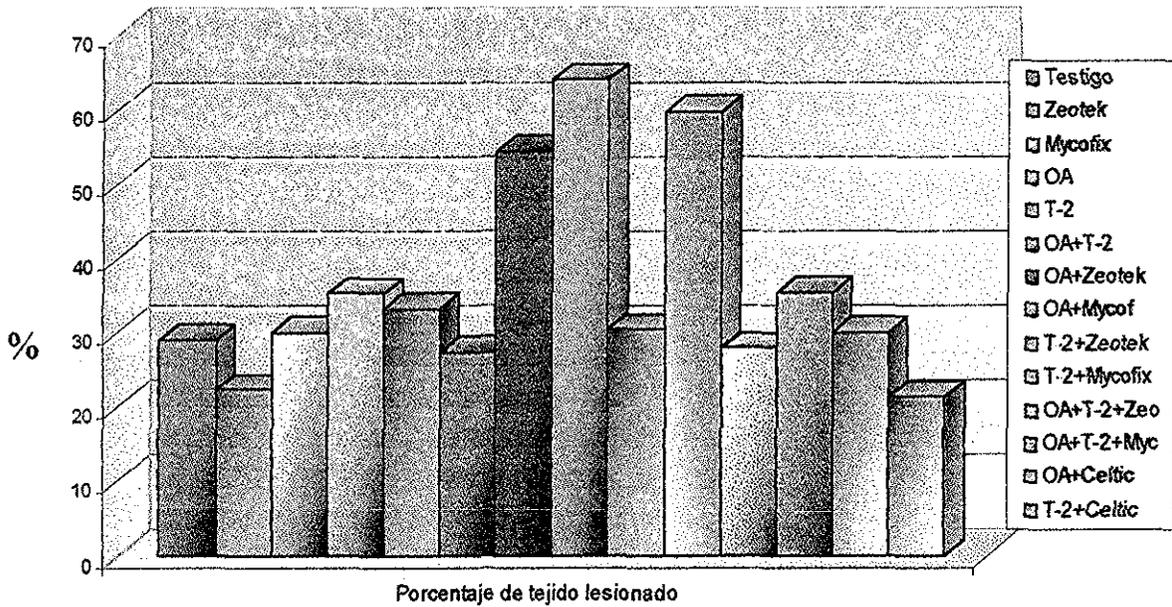


Figura 19. Evaluación histológica de bolsa de Fabricio. Porcentaje de tejido linfoide lesionado en bolsa de Fabricio de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

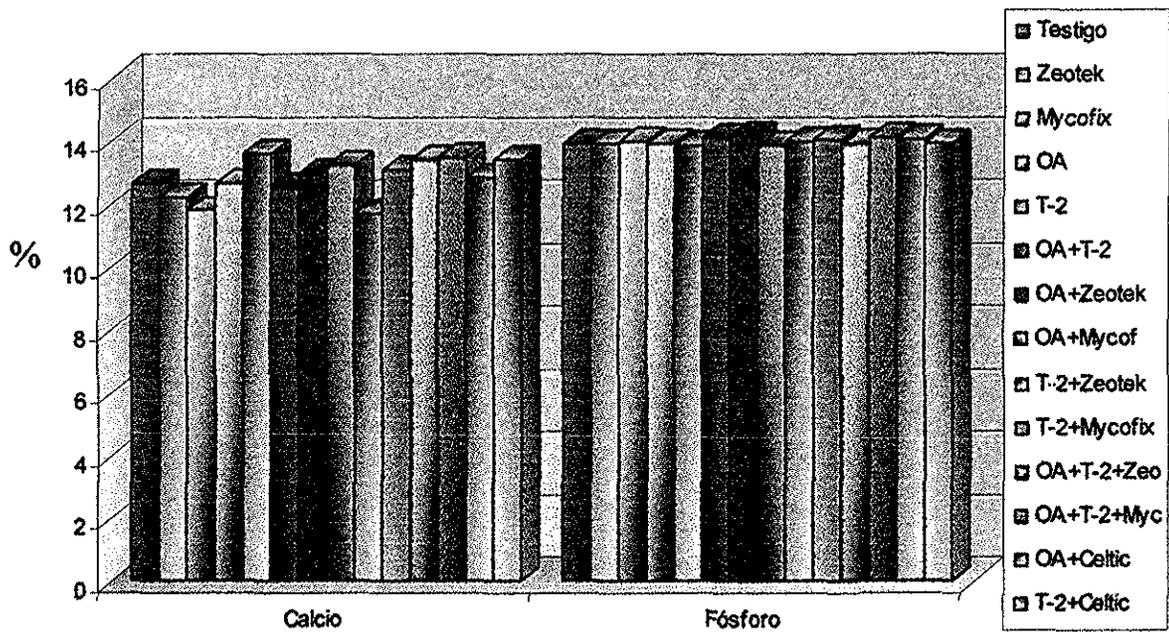


Figura 20. Porcentaje de Ca y P en hueso de de pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con OA y T-2 y tratadas con micotoxinas y secuestrantes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN