



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL

PIGMENTACIÓN EN POLLOS DE ENGORDA
ALIMENTADOS CON DIETAS CONTAMINADAS
CON MICOTOXINAS, ANÁLISIS DE
FUNCIONAMIENTO HEPÁTICO Y PIGMENTOS
EN HÍGADO POR HPLC.

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA

ALFREDO CANELA HIDALGO

TUTOR:
MARÍA DEL PILAR CASTAÑEDA SERRANO

COMITÉ TUTORAL:
ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ
ARIEL ORTIZ MUÑIZ

MÉXICO D.F.

2007



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.

DEDICATORIA:

DEDICO ESTA TESIS A MIS PADRES ADELA Y CARLOS POR SIEMPRE ESTAR CONMIGO EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS, POR SU APOYO INCONDICIONAL QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO, PERO SOBRE TODO POR TODO EL AMOR QUE SIEMPRE ME HAN DADO, SIN USTEDES NO PODRÍA HABER LOGRADO ESTO. LOS AMO

A TI ALEJANDRA POR EL APOYO BRINDADO A CADA MOMENTO, POR LOS DESVELOS QUE TE HICE PASAR, POR ESTAR AHÍ A CADA PASO QUE DABA, PERO SOBRE TODO POR EL AMOR QUE ME BRINDAS DÍA CON DÍA. GRACIAS POR SER MI ESPOSA TE AMO.

A MI HERMANO CARLOS POR SER PARTE FUNDAMENTAL DE MI VIDA, POR TODO TU APOYO Y CARIÑO. POR TODOS LOS MOMENTOS QUE HEMOS PASADO JUNTOS Y NOS FALTAN POR VIVIR. GRACIAS

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por permitirme, vivir y ayudarme a lograr grandes metas en mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por formarme como profesional y como ser humano.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realizar la presente maestría.

Al Centro de Enseñanza, Investigación, Extensión y Producción Avícola (CEIEPAV) de la UNAM y a todos los que laboran ahí, por permitirme realizar, el experimento de mi Maestría.

Al Doctor Ernesto Ávila por todos los consejos y apoyo brindado en todo momento. Pero sobre todo por la confianza que siempre me ha brindado, sin usted no hubiera logrado terminar esta maestría. Gracias por ser mi maestro.

A todos los integrantes de mi comité tutorial: Dr. Ernesto Ávila, Dra. Pilar Castañeda y al Dr. Ariel Ortiz por todos los consejos y correcciones realizadas en la elaboración de la Tesis. Gracias

A UNIGRAS y en especial al Dr. Juan Carlos del Río García, por todo el apoyo brindado para la producción de las Micotoxinas, pero sobre todo por tu amistad sincera, fuiste parte fundamental de este trabajo. Gracias

Al Dr. Carlos López Coello y a la Dra. Irma Tejada Castañeda por todo el apoyo y ánimo que me brindaron pero sobre todo por el tiempo dedicado a la revisión del trabajo y por sus valiosas aportaciones. Gracias

Al Dr. Benjamín Fuente, por sus aportaciones en la elaboración del análisis estadístico, y por su amistad.

A Industrias ALCOSA y en especial al Ing Alejandro Ornelas, Ing Enrique Hernández y a Leticia Yáñez, por colaborar en los análisis del HPLC.

Al Sr. Ezequiel Ramírez y Sra. Luz Barban, por hacerme sentir parte de su familia y por el apoyo brindado, ustedes fueron parte fundamental de este trabajo. Gracias

A todos los integrantes de la obb Bruno, Carlos Ángel, Nacho y Marco Antonio, por todos los buenos momentos vividos juntos y por estar conmigo en las buenas y en las malas, gracias por su amistad.

A mi tía Lidia, por todo el amor, que siempre me das y por ayudarme crecer como persona. Te amo

A mis primas y sobrinas, por todos los buenos momentos que me hacen pasar y por todo el cariño que me brindan a cada momento. Las Amo

A mis amigos de la granja, Neri, Miguel, Isaías, Carlitos y Aarón gracias por su apoyo.

Y a todos los que directamente e indirectamente me ayudaron a culminar este trabajo, mil gracias

INDICE DE CONTENIDO.

1.1	Introducción. -----	1
1.2	Composición química de los carotenoides -----	3
1.3	Características generales de absorción, transporte y distribución de carotenoides en el pollo de engorda. -----	6
1.4	Metodología para la evaluación de la pigmentación.-----	8
1.5	Principales factores que influyen y afectan la pigmentación. -----	11
1.6	Aflatoxinas. -----	17
1.7	Ocratoxinas. -----	22
2.1	Justificación.-----	25
3.1	Objetivos Generales. -----	25
4.1	Objetivos Específicos. -----	26
5.1	Hipótesis. -----	26
6.1	Material y Métodos. -----	27
6.2	Producción de Micotoxinas. -----	27
6.3	Prueba Experimental. -----	29
6.4	Análisis Estadístico. -----	35
7.1	Resultados y Discusión. -----	37
7.2	Parámetros Productivos-----	37

7.3	Pigmentación -----	42
7.4	Enzimas Hepáticas -----	46
7.5	Cromatogramas -----	51
7.6	Lesiones Histológicas. -----	54
8.1	Conclusiones. -----	65
9.1	Literatura Citada. -----	67
10.1	Anexos. -----	75

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Composición de las dietas basales para pollos de engorda. -----	30
Cuadro 2. Parámetros productivos promedio de las aves a las 7 semanas. -----	40
Cuadro 3. Peso semanal de las aves en gramos por tratamiento. -----	40
Cuadro 4. Valor de la pigmentación amarilla semanal en vivo por tratamiento y su promedio. -----	45
Cuadro 5. Valor de la pigmentación amarilla en caliente y en frío de las aves por tratamiento. -----	46
Cuadro 6. Valor de las enzimas TGO TGP y proteínas plasmáticas en el suero de las aves. -----	49
Cuadro 7. Cocientes de las medias de los factores entre Monoésteres, Díésteres y luteína en el hígado de las aves por tratamiento. -----	52
Cuadro 8. Rangos de los factores entre Monoésteres, Díésteres y luteína en el hígado de las aves por tratamiento. -----	52
Cuadro 9. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado de las aves para degeneración grasa por tratamiento. -----	55
Cuadro 10. Análisis de frecuencias para las evaluaciones histopatológicas de los conductos biliares. -----	62
Cuadro 11. Análisis de frecuencias de presentación, para las evaluaciones histopatológicas de las lesiones degenerativas del hígado.-----	63
Cuadro 12. Análisis de frecuencias para los infiltrados hepáticos de linfocitos y heterófilos. -----	64

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Ganancia de peso final por tratamiento. -----	38
Figura 2. Peso semanal de las aves por tratamiento. -----	41
Figura 3. Valor de la pigmentación amarilla en vivo por semana y por tratamiento. -----	45
Figura 4. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado de las aves para degeneración grasa por tratamiento.-----	55
Figura 5. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado de las aves para necrosis del parénquima hepático por tratamiento. -----	56
Figura 6. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado para hiperplasia de epitelio biliar por tratamiento. -----	57
Figura 7. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado para hiperplasia de conductos bilíares por tratamiento. -----	57
Figura 8. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado para necrosis de conductos bilíares por tratamiento. -----	58
Figura 9. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado para infiltrado linfocitario del espacio porta por tratamiento.-----	59
Figura 10. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado para infiltrado de heterófilos en el espacio porta por tratamiento. -----	60

RESUMEN

Para evaluar el daño ocasionado en tejido hepático y en la pigmentación de la piel del pollo de engorda, por el consumo de alimento contaminado con micotoxinas, se realizó un experimento con 176 pollos mixtos de 1 día de edad de la estirpe Ross 308, que fueron divididos aleatoriamente en cuatro tratamientos con cuatro repeticiones de 11 pollos cada una. El tratamiento uno fue el grupo testigo sin micotoxinas, el tratamiento dos tuvo una concentración total de 100 ppb de ocratoxinas, el tratamiento tres 500 ppb de aflatoxinas, y el tratamiento cuatro la combinación de ambas micotoxinas. Las dietas experimentales fueron elaboradas de acuerdo a los requerimientos del NRC para pollo de engorda. Los resultados obtenidos después de 49 días de experimentación mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) entre tratamientos, en los parámetros productivos. En el caso de los componentes de los pigmentos analizados mediante HPLC en el hígado, el tratamiento con aflatoxinas presentó diferencias estadísticas ($P < 0.05$), con respecto a los demás. Para la variable lesiones histopatológicas, se encontraron diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0.05$), siendo diferente el tratamiento testigo a todos los demás en la mayoría de las lesiones evaluadas. Los resultados de los niveles de pigmentación amarilla en vivo, frío y caliente mostraron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$), en los tratamientos con micotoxinas, siendo el tratamiento testigo el que obtuvo los niveles más altos de amarillamiento en todos los casos. La evaluación del funcionamiento hepático por medio de las enzimas TGO Y TGP mostraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), encontrándose más elevada la TGO y disminuida la TGP en los tratamientos con micotoxinas. En el caso de las proteínas totales existió diferencia estadística significativa ($P < 0.05$), en los tratamientos con micotoxinas, siendo estos los que se encontraron más disminuidos comparado con el tratamiento testigo.

Estos resultados, sugieren un efecto negativo de las micotoxinas solas y en combinación, en los parámetros productivos, pigmentación en vivo, frío y caliente. Así mismo la enzima TGO en lesiones hepáticas se eleva de manera significativa en condiciones de micotoxicosis. Los niveles de proteínas plasmáticas

se reducen debido principalmente a la reducción de globulinas y el factor que existe en la relación entre los ésteres y luteína libre en hígado, puede ser una herramienta para diagnosticar una micotoxicosis.

Pigmentación en canales de pollo de engorda alimentados con dietas contaminadas con micotoxinas, análisis de funcionamiento hepático y pigmentos en hígado por HPLC.

1.1 Introducción:

La avicultura es una actividad altamente productiva en México, debido a que es la principal industria transformadora de proteína animal, la cual por medio del aprovechamiento de líneas de aves genéticamente especializadas, se encarga de cubrir una gran parte de las necesidades de proteína animal de México ⁽¹⁾.

El sector avícola mexicano participa con el 63.2% de la producción pecuaria; 33% aporta la producción de pollo, 30.1% la producción de huevo y 0.20% la producción de pavo. ⁽¹⁾

En México el consumo per-cápita de pollo ha aumentado de 19.9 Kg. en 2000 a 24.2 kg. durante 2005, lo que representa un incremento del 21.6%. Su importancia radica en el papel estratégico que juega en la alimentación del mexicano en amplios estratos de la población, por ser una fuente que proporciona proteínas de origen animal de bajo precio en el mercado, esto se refleja en que 6 de cada 10 personas (61.41%) incluyen en su dieta productos avícolas. ⁽¹⁾ Esto se explica por el hecho de que en el periodo de (de 1994 al 2005), la producción de huevo, pollo y pavo han tenido tasas de crecimiento anual del 4.1%, 5.5% y 6.4% respectivamente. ⁽¹⁾

La coloración de las canales es un factor económico muy relevante de particular importancia en la industria avícola, ⁽²⁾⁽³⁾ y en especial de la mexicana, ya que la apariencia visual, especialmente la pigmentación, es la característica más importante para determinar la selección por el consumidor ya que generalmente relacionan el color con el sabor de los alimentos. ⁽⁴⁾

Una piel amarilla en los pollos de engorda se asocia con aves sanas, por eso muchos de los consumidores prefieren el color amarillo en la piel y lo relacionan a un ave libre de enfermedades. ⁽⁵⁾

Es decir la demanda que ejerce un ama de casa que prefiere un pollo fresco, sano, con apariencia de haber sido criado en campo, con color fuerte y definido

(sensación de salud), indica que este último es el elemento más importante en la decisión preferencial del consumidor. Es por ello la preocupación de tener una buena pigmentación tanto en la piel de la canal del pollo de engorda como en la yema del huevo. ⁽⁵⁾ Pero el hecho de preferir productos avícolas mejor pigmentados ha dado origen a problemas de tipo económico, ya que el consumidor al preferir estos productos obliga al productor a utilizar los pigmentos, aumentando el costo de producción. ⁽⁶⁾

Esta suplementación de productos ricos en xantofilas representa un alto costo de producción entre 8 y 10% del total de la dieta, adicionalmente cuando las parvadas no alcanzan la pigmentación comercial requerida es causa de depreciación del valor comercial de las parvadas. Considerando que las fuentes de xantofilas son costosas, la industria avícola busca los mecanismos de suplementar los pigmentos necesarios en la dieta del pollo de engorda para conseguir la máxima pigmentación al mínimo costo.

Los productos avícolas en México por lo general se prefieren con una tonalidad amarilla o amarilla naranja (yema del huevo, piel, y patas de pollo de engorda). Actualmente en México, las principales fuentes naturales concentradas de xantofilas empleadas para la formulación de raciones en avicultura son carotenoides de flor de cempasúchil, carotenoides sintéticos y frutos del género *Capsicum*. ⁽⁷⁾

Debido a esto la mayoría de las empresas han cambiado su visión de crianza y procesamiento de pollo hacia un concepto de calidad cuidando cada vez más los pasos de producción, ya que la preferencia del consumidor mexicano cada vez es más exigente y busca un pollo fresco, bien pigmentado, de buen peso, tamaño y apariencia. ⁽²⁾⁽⁴⁾

1.2 Composición química de los carotenoides.

Todos los carotenoides, pertenecen a la clase de los polienos o sea que son largas cadenas con dobles ligaduras conjugadas. La presencia de estas dobles ligaduras conjugadas explica el color intenso de los carotenoides que van desde el amarillo al rojo y al púrpura.

Los carotenoides son sustancias solubles en lípidos, de naturaleza terpenoide, esto significa, que están formados por subunidades repetidas (ocho isoprenos) de la molécula de cinco carbonos denominada isopreno, cuyo arreglo se hace inverso en el centro, y pueden ser de cadena lineal o tener ciclizaciones en los extremos. Los carotenoides tienen la característica de poseer un esqueleto bilateralmente simétrico de cuarenta átomos de carbono. Cada mitad puede ser considerada desde un punto de vista estructural formal, como constituida por cuatro unidades isoprenicas unidas cabeza a cola.

Existen en forma libre disueltos en la fracción lipídica del tejido vegetal, formando complejos con proteínas, unidos a hidratos de carbono por medio de un enlace glucosídico, o como ésteres de ácidos grasos (palmítico y linoleico). ⁽⁸⁾

Los carotenoides se han dividido en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química: ⁽⁸⁾⁽⁹⁾

1-Los carotenos que son hidrocarburos y contienen solo carbón e hidrogeno en su molécula. Estos son solubles en éter y poco en etanol.

2- Xantofilas o oxicarotenoides que contienen oxigeno, carbón e hidrogeno y se consideran productos de la oxidación de los carotenos, por los átomos de oxígeno que contienen, por eso se conocen como oxicarotenoides ^{(9) (10)}. Se presentan como ácidos, aldehídos o alcoholes y son solubles en etanol, metanol y éter. ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

Los carotenoides representan uno de los más amplios grupos de pigmentos naturales responsables de la pigmentación amarilla de la piel de los pollos de engorda y de la yema del huevo. Los carotenoides no pueden ser sintetizados de novo por las aves, estos deben de ser asimilados de las plantas o granos incluidos en la dieta, los cuales son sintetizados y acumulados en las plantas, debido a que

forman parte de la fotosíntesis. ⁽¹²⁾

La presencia y distribución de los carotenoides en mamíferos es muy limitada, pero en otros vertebrados como las aves, peces, reptiles y anfibios es muy amplia, y de gran importancia ya que participan en funciones como el dimorfismo sexual, camuflaje, patrones de colores en la piel y plumas etc. Estos animales muestran una amplia diversidad en el tipo de carotenoides, y habilidad para modificar las estructuras de los carotenoides que obtienen de la dieta. ⁽¹¹⁾

En la naturaleza la función más importante de los carotenoides es la de precursores de la vitamina A y sus análogos. Todos los animales la requieren para funciones como la vista, la reproducción, el desarrollo de la piel y las mucosas, así como la resistencia a varias infecciones. En los complejos con proteínas actúan como efectores alostéricos en reacciones enzimáticas y como modificadores de la permeabilidad de las membranas. ⁽¹¹⁾

Algunos autores han clasificado a los carotenoides tomando en cuenta su capacidad pigmentante de la piel del pollo y la yema de huevo, y si pueden o no ser precursores de la vitamina A. Ya que existe una gran similitud entre las estructuras químicas de la vitamina A y la de algunos carotenoides; los que tienen un anillo β ionona presentan actividad biológica de provitamina A, ya que en la mucosa intestinal de los animales superiores se oxida y los transforma en retinal. Uno de los principales carotenoides que tienen esta característica es el β -caroteno ⁽⁷⁾⁽⁵⁾

Cabe indicar que los carotenos, además de servir como precursores de la vitamina A en el organismo humano, también cumplen una función biológica protectora contra la formación y la acción de los radicales libres. ⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

La comprensión química de los carotenoides implica: Entender las xantofilas importantes para la pigmentación que se encuentran presentes en alimentos utilizados comúnmente, y tener conocimiento de los carotenoides contenidos en los ingredientes de la dieta. ⁽¹¹⁾

En la actualidad los carotenoides comerciales que tienen más importancia para el color amarillo en la avicultura son:

La luteína, pigmento amarillo presente en la alfalfa, maíz amarillo, gluten de maíz amarillo, harina de alfalfa, algas como *Chlorella Pyrenoidosa* y principalmente la flor de cempasúchil ⁽⁶⁾

La zeaxantina, molécula de color amarillo-naranja presente también en los productos antes mencionados. ⁽⁶⁾

El etil-éster del ácido apocarotenoico (apoéster) molécula de origen sintético, de color amarillo. ⁽¹²⁾ Existen otros carotenoides como la cantaxantina, citranaxantina, capsantina (pigmentos rojos) que se depositan cuantitativamente en la yema del huevo y la piel de pollo de engorda. Estos pigmentos son utilizados en la alimentación de las aves para complementar las fuentes de pigmento amarillo y lograr la coloración amarilla o amarilla-anaranjada. ⁽⁶⁾

Actualmente la flor de cempasúchil ("flor de muerto"), es la que más se utiliza en la industria avícola como fuente de luteína natural, los pétalos de la flor se trituran formando una pasta pulverizada, a partir de la cual por un proceso de deshidratación e hidrólisis alcalina, se obtienen los pigmentos. ⁽¹³⁾

Los carotenoides purificados se estabilizan con el fin de prevenir la oxidación e isomerización. El principal carotenoide del cempasúchil, es la luteína (3,3´dihidroxi - β caroteno) encontrándose en su forma diéster el 95%, junto con la lutein-dipalmitato, miristato-palmitato y palmitato-estearato, siendo estos los principales componentes en su forma nativa. ⁽¹⁶⁾

Estos se comercializan de forma encapsulada, ofreciendo una buena dispersión cuando se añaden a las dietas. ⁽¹⁷⁾

La cantidad de pigmento que se requiere suplementar a los alimentos de las aves, representan un considerable costo para los productores por lo que es importante entender el proceso de pigmentación y todos los factores que favorecen o que la afectan. ⁽⁶⁾

1.3 Características generales de absorción, transporte y distribución de carotenoides en el pollo de engorda.

En todos los animales, antes de que los carotenoides que son ingeridos con la dieta alcancen sus órganos blancos o tejidos ellos deben pasar a través del tracto digestivo y ser distribuidos en el cuerpo. Los carotenoides como ya se mencionó, son componentes liposolubles, en general siguen la ruta que se ocupa para la digestión de lípidos. Los ácidos grasos del retinol o de los carotenoides son hidrolizados en el intestino delgado y absorbidos en la forma libre por el lumen intestinal. ⁽¹¹⁾

Los carotenoides se asimilan, a nivel del duodeno y parte superior del yeyuno, el resto de carotenos son absorbidos en la parte superior y media del íleon. Esta absorción es promovida en presencia de ácidos y sales biliares ^{(14) (13) (6)}

Los carotenoides son entonces reesterificados en las células de la mucosa y transportado en quilomicrones vía sanguínea al hígado, en el caso de las aves, no cuentan con sistema linfático, por lo tanto pasan directo al torrente sanguíneo y de este al hígado. La liberación de carotenos en la sangre y tejidos, debe ser de una manera controlada, esta regulación también la lleva a cabo por medio de lipoproteínas acarreadoras de muy baja y alta densidad y por varios receptores de proteínas. ⁽¹¹⁾

Los carotenoides presentes en el plasma, no están esterificados y generalmente se concentran en la fracción de la lipoproteína de alta densidad que funciona como transportador de las xantofilas hacia los órganos blancos. ⁽¹³⁾

Se ha visto que la mayoría de los carotenoides en sangre (90%), se encuentran en la fracción de las HDL y solo un 10% en la fracción LDL. Es decir en el pollo de engorda la relación es de 9: 1. ⁽⁹⁾

Se ha aislado e identificado que la apolipoproteína A-1 es la principal transportadora de carotenoides en la fracción de las HDL. La misma proteína A-1 que se encuentra también en la fracción de las LDL contribuye también al transporte de carotenoides, pero como componente de menor importancia. ⁽¹¹⁾

Después de cruzar la barrera intestinal, la luteína libre representa el 96% del total, mientras que el 4% restante es en forma mono-éster ⁽¹⁷⁾

En el hígado, la luteína libre representa cerca del 80%, mientras que los mono-ésteres representan el restante 20%. En el hígado, los carotenoides van a ser

deacilados, esterificados y almacenados con el fin de ser disponible y distribuidos lentamente hacia órganos blancos como lo son los tejidos grasos, piel y patas. En la grasa subcutánea, la luteína es esterificada y la forma dominante es la luteína diéster. ⁽¹⁷⁾

Por lo tanto, la capacidad pigmentante está relacionada con el grado de asimilación a nivel de intestino delgado en primer lugar y en segundo por la afinidad específica o preferencia de cada carotenoide por depositarse en un tejido determinado. ^{(18) (13) (6)}.

1.4 Metodología para la evaluación de la pigmentación.

La habilidad para describir un color en términos simples es difícil o casi imposible, pues aún teniendo una excelente visión, existen serias limitaciones que interfieren en la correcta evaluación del color de piel y tarsos en pollo de engorda. (19)

El color es una característica física de la materia. Cuando la luz choca contra una superficie, una parte es absorbida y la otra es emitida como ondas de diferentes longitudes, dependiendo de la longitud de onda, será el color percibido por el ojo. Un concepto interesante, con respecto a la forma en que el ojo humano percibe los colores es la saturación. Así cuando en un área existe un exceso de partículas de un color determinado, por ejemplo amarillo, el ojo humano percibe un color diferente, el anaranjado. (14)

Hay muchos métodos para evaluar la pigmentación en piel de pollo y la yema del huevo. La selección del mejor método o del más adecuado, debe ser en función de alguna situación particular, debido a que un solo método no es adecuado para llenar todas las posibles expectativas. (20)

Por los diferentes criterios de interpretación de los pigmentos, ha tenido que desarrollar, métodos tanto indirectos como directos. (20)

1. Método de comparación directo o visual: Consiste, en comparar directamente mediante observación visual los productos avícolas con patrones preestablecidos.; así en el caso de la yema del huevo, se compara con el abanico colorimétrico como el de Roche, dispositivo que consta de quince tonalidades, desde amarillo pálido hasta naranja intenso. La desventaja de este método es que los patrones de coloración no son una medida exacta, ya que varía de una persona a otra; no describe con precisión el color por incapacidad de los ojos a distinguir las diferencias verdaderas en concentración de pigmentos y puede haber variación entre lectores. (7)
2. Colorimetría de reflectancia: Por los diferentes criterios de interpretación de los pigmentos, se ha tenido que desarrollar, métodos más confiables y precisos como el colorímetro de reflectancia. La colorimetría de reflectancia, es una medición matemática de la reflexión de un haz de luz de intensidad

conocida y estos pueden ser con equipos portátiles o fijos, pueden emplearse tanto en interiores como en exteriores, sin que esto implique diferencias en las lecturas y no necesitan una preparación especial ni previa de la muestra, motivo por el cual ha ido difundiéndose más su uso.^{(20) (21)}

Con la finalidad de evitar la subjetividad en la evaluación del color de la piel de pollo, se utiliza como método de referencia la medición del color con el colorímetro Minolta CR 400. Este instrumento puede medir hasta 20 colores diferentes, sin embargo, en el caso de las mediciones para la piel del pollo, se usan tres variables, L* la luminosidad va de blanco al negro, a* es el eje de los rojos-verdes y el b* el de los amarillos-azules, las cuales se basan en el sistema CIELAB.⁽²²⁾

El sistema CIELAB evalúa:

- L* Luminosidad: la cual va de cero, negro absoluto, hasta el 100 que corresponde al blanco absoluto. En el caso de la piel del pollo, el rango aceptable para esta variable es entre 64 a 72.
- a* Enrojecimiento, que oscila de -60 a +60, donde los valores con tendencia negativa corresponden a los colores verdes y los de tendencia positiva corresponden a los rojos. El valor mínimo para esta variable es 2.
- b* Amarillamiento y azulamiento, varían de -60 a +100; siendo los azules los valores negativos, mientras que los amarillos cifras positivas. Aquí el valor mínimo es el 41, estos valores de los rangos de luminosidad, enrojecimiento y amarillamiento son los utilizados por la avicultura comercial.^{(19) (22)}

El uso del colorímetro de reflectancia tiene las siguientes ventajas:

- Elimina la subjetividad de lecturas
- Elimina el factor de fatiga del evaluador
- Evita la variación entre distintos evaluadores
- Posee patrones de referencia
- Se expresa en forma numérica

Las desventajas serían:

- El precio relativamente alto por lo que no cualquiera puede adquirirlo.

- No cualquiera puede interpretar los colores y tonos en forma numérica.
- El lugar de disparo y la cantidad de mediciones que se hagan sobre una misma muestra, son consideraciones que llevan a conclusiones dispares.⁽²⁰⁾

En la actualidad, es posible decir que la única técnica de rutina de medición de pigmento cutáneo en los pollos de engorda en granjas, es la colorimetría de reflectancia a través de equipos sofisticados como el colorímetro Minolta CR-400.
(22)

Método Indirecto.

Los indirectos son el método aprobado HPLC o CLAR (Cromatografía de líquidos de alta resolución), los cuales se basan en la concentración y perfil de xantofilas contenidas en una muestra analizada como lo son; alimento, suero, piel de la pechuga, piel de los tarsos yemas de huevo y órganos como el hígado. Con el CLAR todas las clases de carotenoides pueden ser separados. El análisis de carotenoides por CLAR a ayudado a la industria avícola a tener un control sobre la pigmentación del pollo de engorda, debido a que los productores, usan los análisis hechos por CLAR, para formular las dietas, resultando una mejor pigmentación, además que gracias al CLAR se ha logrado localizar y comprender los sitios de absorción de carotenoides en el intestino.⁽²⁴⁾

Se consideran indirectos, por que correlacionan el valor obtenido de la muestra con un determinado color observado, aunque esta correlación no dejará de ser siempre una estimación.⁽²⁵⁾

Recientemente se ha estandarizado una metodología de CLAR, para la medición no solamente de pigmentos carotenoides, sino hasta metabolitos de ellos en diferentes sitios fisiológicos como lo son el hígado y plasma.⁽²⁴⁾

En estudios realizados se ha visto, que la deposición de carotenoides (luteína) y sus metabolitos monoésteres y diésteres), en los tejidos se modifica en presencia de aflatoxinas y ocratoxinas, lo que refuerza la teoría ya hecha de que el efecto de palidez causado por estos agentes puede ser distinguida por el análisis de los diferentes tejidos por medio de CLAR⁽²⁴⁾

Esto ha hecho que el CLAR, se convierta en una herramienta útil y necesaria en la industria avícola debido al crecimiento de esta en los últimos años, y a las necesidades de buscar nuevas opciones.

1.5 Principales factores que influyen y afectan la pigmentación.

Zona geográfica:

La demanda de pigmentación y las preferencias de los consumidores son muy variables entre países así como, entre las diferentes regiones del mismo país; por ejemplo, se requiere una alta pigmentación cutánea (amarillo naranja) para la parte central de México, lo que no sucede con la zona sureste o norte del país. ⁽¹³⁾

Tipo de agente pigmentante:

Respecto a los ingredientes pigmentantes debemos considerar dos aspectos claves que son el tipo de carotenoides y los productos comerciales que los tienen. Existe una gran cantidad de xantofilas, pero no todas tienen el mismo valor pigmentante para la piel del pollo y no siempre sustituibles unas por otras, en lo que respecta al color observado. ⁽²³⁾

Los productos naturales disponibles en el mercado nacional derivan de los pétalos de flor de cempasúchil (amarillo) y de chiles del género *Capsicum* spp (rojo). En el caso de productos de flor los componentes que tienen un poder pigmentante alto son: la trans-luteína y la trans-zeaxantina. Para el pigmento rojo, los componentes de mayor interés son la trans-capsorrubina y la trans-capsantina que son los que aportan el color rojo. ⁽¹³⁾

En el caso de fuentes sintéticas el agente pigmentante de los productos amarillos es el ácido etílico 8-β- apo-carotenoico, el cual proporciona un color amarillo anaranjado semejante al de la zeaxantina del maíz.

La cantaxantina es el principio activo para los pigmentos rojos sintéticos. ⁽¹³⁾

Niveles de inclusión en la dieta y tiempo de consumo:

La concentración de xantofilas en el alimento varía dependiendo de las necesidades de la región. También debido a que las aves no son capaces de sintetizar los carotenoides de novo, dependen del consumo de ellos en el

alimento. Si las aves no consumen la cantidad suficiente de carotenoides para saturar los tejidos de destino, no se observará el color esperado.

Se ha reportado en diversos experimentos, que al ajustar el consumo de xantofilas a la misma cantidad en gramos por ave, los grados de pigmentación de la piel eran diferentes cuando se administraban repartidas en distintos periodos de ingestión quedando demostrado que la etapa más recomendable era dos a tres semanas antes del sacrificio, administrando una dosis de 80 ppm de xantofilas provenientes de extractos de flor de cempasúchil por tonelada de alimento, para adquirir una buena pigmentación amarilla. ^{(14) (13) (6) (23)}

Composición de la ración:

Los ingredientes que se utilizan comúnmente en la elaboración de los alimentos balanceados, pueden aumentar o disminuir la pigmentación de las aves según sea el caso, así por ejemplo la inclusión de aceite, grasas o sebos en el alimento, tienden a aumentar la pigmentación de la yema o la piel del pollo de engorda mediante una mejor absorción de las xantofilas. ⁽¹³⁾

La adición creciente de grasa a partir de 2% en el alimento hasta un máximo del 6%, mejora la absorción de carotenoides pigmentantes. Cuando los niveles se incrementan en mayor nivel los efectos son negativos, debido a un aumento en la velocidad de tránsito del alimento en el intestino. ⁽²⁴⁾⁽²⁶⁾

La cantidad de grasa no es el único punto. De acuerdo al mecanismo de generación y absorción de micelas que permiten el transporte de lípidos, estos requieren formar interfases con el agua proveniente del alimento en el intestino. Este proceso se verá favorecido por la presencia de ciertos tipos de grasas, especialmente los monoglicéridos de ácidos grasos de cadena corta o los ácidos grasos insaturados de cadena larga. De esta manera la relación saturación / insaturación de una grasa, no solo determina su energía metabolizable sino también la capacidad de absorción de carotenoides. Por esta razón es recomendable que la grasa utilizada en vista de la pigmentación sea de un alto grado de insaturación para facilitar la absorción. ^{(24) (26)}

Los niveles de algunas vitaminas y antioxidantes pueden afectar el grado de pigmentación. La vitamina E cuya principal función es como antioxidante intra y

extracelular, se utiliza rápidamente en presencia de sustancias oxidantes. Si el nivel de vitamina E en los tejidos no es suficiente, el organismo moviliza a los carotenoides para que se oxiden y protejan de esa manera a los tejidos. Pero habrá así una disminución de los depósitos de carotenoides por lo tanto una menor pigmentación. Mientras mayor sea el nivel de grasa en el alimento, mayor debe ser el nivel de Vitamina E suplementada.

Otra vitamina relacionada con la pigmentación es la vitamina A, niveles superiores a 25000 U.I / Kg se reflejarán en el progresivo deterioro del grado de pigmentación, probablemente por alteración competitiva de la absorción de carotenoides. ⁽²³⁾

En el caso de los antioxidantes, son utilizados en la industria de fabricación de alimentos balanceados, con el fin de retardar la oxidación de las grasas animales y los aceites vegetales empleados para incrementar el valor energético del alimento; así como a las vitaminas y los pigmentos.

Los antibióticos que se emplean a nivel nutricional en los alimentos para las aves favorecen una mejor pigmentación, lo anterior es debido a que controlan enfermedades subclínicas y mantienen el tracto intestinal sano, por lo que hay una mejor absorción de nutrimentos y pigmentos. ⁽⁶⁾

Edad y genética de las aves:

Los pollos de engorda bajo explotaciones normales ganan peso y con ello depositan grasa en la canal, lo cual permite una mejor deposición de las xantofilas, obteniéndose a mayor cantidad de grasa mayor pigmentación. ⁽⁶⁾

No todas las líneas de pollo de engorda presentan la misma eficiencia para fijar pigmento en la piel, debido a diferencias metabólicas entre ellas, la razón probablemente tiene que ver con la diferente tasa de depósito de grasa subcutánea entre líneas. ^{(27) (14)}

Condición de almacenamiento y Estado Físico- Químico de los productos pigmentantes:

La capacidad pigmentante de una xantofila puede variar de acuerdo al arreglo estructural en que se encuentre su molécula. ⁽²³⁾

El contacto prolongado del pigmento con el calor, la luz, el oxígeno y el proceso

de fabricación, pueden alterar el porcentaje relativo de los componentes pigmentantes en el producto debido a que estos factores pueden transformar las formas TRANS a CIS (isomerización) afectando drásticamente su valor pigmentante.⁽²⁸⁾

La proporción entre trans y cis carotenoides en los compuestos naturales es muy variable del 60 al 90% para los trans carotenoides y entre 30 y el 10 % para los cis carotenoides. Los carotenoides en su forma trans son considerados como pigmentantes muy efectivos, por lo que puede concluirse que los carotenoides de la dieta con un alto porcentaje en configuraciones trans tendrán eficiencia pigmentante superior a aquellos con un porcentaje inferior.⁽²⁸⁾

La gran mayoría de las xantofilas naturales se encuentran en forma esterificada con ácidos grasos, lo que disminuye su biodisponibilidad. El proceso de saponificación consiste en romper el enlace a éster y dejar las xantofilas libres.⁽²⁹⁾

Transporte y procesamiento:

La finalización del ciclo productivo del pollo de engorda, no es precisamente el final de los problemas de pigmentación. El estrés de la manipulación, captura, transporte, los golpes, el aturdimiento, el escaldado, el desplume mecánico y las contaminaciones durante el enfriamiento, se reflejan negativamente sobre el color final de la canal.⁽²³⁾

Antes de llegar a la planta procesadora se producen pequeñas hemorragias, debido a la rotura de vasos capilares durante la captura, manipulación y transporte, y estas hemorragias se reflejarán en un cambio negativo del aspecto de la canal.⁽²³⁾

Se menciona que las aves tranquilas tienen un proceso de desangrado mejor. El mal desangrado, se refleja en coloración rojo rosacea en algunas partes de la canal. Esto puede disminuirse si se revisan aspectos tan críticos como el voltaje, amperaje del aturdidor y el tiempo de desangrado. El aturdimiento adecuado inmoviliza al ave y estimula la contracción cardíaca, facilitando el desangrado.⁽²³⁾

Evitar el estrés del pollo también, ayuda a un mejor desplumado debido a que un pollo que muere estresado requerirá de mayor fuerza, temperatura y tiempo de escaldado para remover las plumas, lo que lo dañará la epidermis, por el

contrario lograr el mínimo estrés del pollo facilitará que las plumas se desprendan fácilmente al aplicar la fuerza adecuada, temperatura y tiempo de escaldado, logrando que el pollo se desplume bien y que el daño en la epidermis sea nulo o mínimo.

Para obtener un desplumado óptimo del pollo, se necesita una temperatura en el agua de 60°C, sin embargo a esta temperatura se produce separación de la epidermis, arrastrando con esto el pigmento de la piel y produciendo que el pollo pierda coloración, genéricamente esto se conoce como pollo "tallado" el cual, recibe castigos económicos por mala presentación del producto en el mercado público. ⁽¹⁴⁾

La temperatura óptima del agua de escaldado es de 52°C a 53°C y el tiempo recomendado es de un minuto con quince segundos a un minuto con treinta segundos, al sobrepasar esta temperatura o aumentar el tiempo de permanencia en los tanques se produce daño a la epidermis y arrastre del pigmento en la piel. ⁽²³⁾ ⁽¹⁴⁾

El tipo de desplumadoras es otro factor muy importante para el buen cuidado de la epidermis, ya que las desplumadoras que contienen muchos dedos en sus masas serán muy agresivas en las zonas donde el pollo ya fue desplumado, por lo que es conveniente tener como desplumadoras finales aquellas que tengan de 6 a 8 dedos. La dureza de los dedos de las desplumadoras no debe exceder de sesenta y en algunos puntos deberá usarse dureza de cuarenta y cinco. ⁽¹⁴⁾

Estado de salud :

La primera condición para alcanzar el grado de pigmentación deseado es trabajar con parvadas sanas. La tasa de deposición de carotenoides en la grasa y el tejido subcutáneo puede ser influida gravemente por la salud de las aves, cualquier tipo de enfermedad que disminuya el consumo de alimento, lesione las superficies y mecanismos de absorción, así como los sistemas de transporte, va a provocar una ingesta menor de carotenoides, así como su deposición y con ello el color final de la canal. ⁽²³⁾

De los problemas de salud más habituales, los que tienen mayor importancia

como agentes causales de despigmentación o pigmentación alterada, son enfermedad crónica respiratoria, Reovirus, coccidiosis, Newcastle, desbalances nutricionales, aflatoxinas y ocratoxinas⁽³⁰⁾

Las principales micotoxinas que han sido reportadas como contaminantes naturales de granos y semillas son seis: Aflatoxinas, Ocratoxinas, Patulina, Zearalenona, citrinina y ácido penicílico.⁽³¹⁾

En países de Latino América como lo son Brasil, Perú, México, Colombia, Venezuela y Argentina, los reportes de micotoxinas revelan la presencia principalmente de Aflatoxinas, Ocratoxinas, Toxina T2, DON, zearalenona y otras toxinas de *Fusarium*, en ese orden de importancia por su impacto económico.⁽³²⁾

1.6 Aflatoxinas:

La contaminación con aflatoxinas (AF) es un problema común en todo el mundo, en el caso del sur de los Estados Unidos de Norteamérica, se calcula que el 20% de los cultivos de maíz en condiciones normales de están contaminados, y este porcentaje puede aumentar si los niveles de humedad se incrementan por excesivas lluvias.⁽³²⁾

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* principalmente, que se diferencian de las toxinas bacterianas por carecer de naturaleza proteica o inmunogénica.⁽³³⁾

Las micotoxinas en la industria avícola son de gran importancia ya que causan severos trastornos en la producción, incrementando el periodo de crianza y disminuyendo la ganancia de peso, lo que se traduce en pérdidas económicas para el productor. Además de ello tienen importancia en salubridad pública ya que los residuos de estas en los productos de origen animal causan severos daños al hombre al consumirlos.⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾

En términos generales resulta difícil calcular el daño ocasionado por las micotoxinas ya que sus efectos son subjetivos, como por ejemplo: peor desempeño productivo, vacunaciones fallidas asociadas a otras enfermedades que dificultan una evaluación más exacta. Por eso la gran cantidad de estudios no van dirigidos al efecto letal, sino a la repercusión económica que representa la ingesta

de dosis subletales, las cuales además de producir inmunodepresión en el animal afecta todos los parámetros productivos ⁽³⁶⁾, debido a que las micotoxinas tienen como principal destino órganos como el intestino, el hígado y el riñón, los cuales son de suma importancia para el desarrollo del animal, en especial en lo que respecta a la digestión y a la absorción de nutrimentos alterando el transporte de lípidos del hígado, depresión del volumen del paquete celular y disminución de colesterol en suero. ⁽³³⁾⁽³⁷⁾

La intensificación de la avicultura, ha hecho a las aves una de las especies más vulnerables a la acción de las micotoxinas por existir una total dependencia de los alimentos concentrados para su alimentación

Las aflatoxinas B1, B2 y G1, G2, han sido identificadas como contaminantes naturales de alimento y materias primas para alimento de las aves, ⁽³⁵⁾ las letras B y G se refieren a la fluorescencia azul (blue) y verde (green) observada bajo luz ultravioleta de onda larga. Generalmente la AFB1 es encontrada en mayor concentración que las otras aflatoxinas, siendo la más tóxica, con actividad carcinogénica, teratogénica y mutagénica. El hígado es el órgano que afecta en mayor grado, por lo que es considerada una hepatotoxina. ⁽³⁸⁾. Es importante resaltar a *Aspergillus flavus*, como hongo patógeno para todas las especies de aves capaz de producir Aspergilosis en pollos y pavos. ⁽³⁸⁾

La cantidad de toxina que produce el hongo, depende de diversos factores como son: Humedad, temperatura y substrato ⁽³⁸⁾⁽³⁴⁾, lo cual va a permitir que pueda encontrarse más de una toxina en el alimento. Es importante considerar esto, pues la presencia de hongos en los cereales y otros alimentos, no garantiza necesariamente la presencia de toxinas. De la misma manera, la ausencia de hongos tóxicos no garantiza la ausencia de micotoxinas. ⁽³¹⁾

Acción de las aflatoxina sobre las aves.

La aflatoxina B1 esta clasificada como un componente altamente tóxico para muchas especies de animales y para casi todos los organos de diversas especies animales. ⁽³⁸⁾ ⁽³⁴⁾ Sus efectos biológicos se agrupan en cuatro categorías; daño hepático agudo o crónico, reducción en el rango de crecimiento, inducción de efectos teratogénicos e interferencia con los mecanismos de defensa y respuesta inmunológica. ⁽⁴⁰⁾

La toxicidad va a depender de la dosis ingerida, del tiempo de exposición, de la especie, de la raza, de la edad y el sexo del animal que las consuman. La aflatoxicosis aguda con dosis altas (5-10 ppm), se caracteriza por muerte súbita debido a falla hepática. Las aves presentan depresión, anorexia, estado comatoso y muerte, histológicamente se aprecia necrosis periportal asociada a la proliferación de conductos biliares y degeneración grasa del epitelio de los mismos. En los casos de intoxicación crónica con dosis menores de 5 ppm, puede presentarse pérdida gradual del apetito, disminución en la ganancia de peso, disminución del ritmo de crecimiento y aumento del rango de conversión alimenticia de 2.0 a 2.3 o 2.4, ya que provoca falla en la utilización de nutrimentos, lo que tiene un impacto económico importante; siendo además capaz además de inducir carcinoma hepático, cambio grasa e hiperplasia de conductos biliares. ⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾

También se ha visto que durante una aflatoxicosis, las enzimas hidrolíticas sintetizadas en el páncreas y encargadas de la digestión de carbohidratos, proteínas y lípidos están disminuidas marcadamente. Esta disminución en sus actividades es el resultado de la inhibición de síntesis de proteínas debido a la aflatoxina. ⁽⁴³⁾ Además la actividad de la transaminasa pirúvica glutamica (GPT) y la glutamil tranferasa (GGT) se incrementa indicando daño hepático provocado por estas toxinas. ⁽⁴⁴⁾

En general las aflatoxinas actúan alterando la absorción o el metabolismo de los nutrimentos y producen alteraciones a nivel endocrino, seguidas de la depresión de la respuesta inmune. Todos los sistemas orgánicos del animal se ven alterados por las micotoxinas, lo que hace difícil cualquier diagnóstico. ⁽³³⁾

La inmunosupresión causada por las aflatoxinas ha sido demostrada en pollos y pavos. El mecanismo exacto de como la aflatoxina induce la inmunosupresión es desconocida. Pero los efectos adversos de la aflatoxina en el complemento, interferon y proteínas plasmáticas son tal vez el resultado del daño hepático y la inhibición de la síntesis de proteínas.⁽³⁶⁾ disminución de los niveles de la albúmina en sangre, además de la disminución de globulinas y por consecuencia una reducción de anticuerpos circulantes.⁽⁴⁵⁾

Las aflatoxinas tienen efectos adversos en la respuesta inmune celular y humoral. Se ha observado que a grandes niveles de aflatoxina (0.6-10 ppm), se puede ver inhibida la síntesis de inmunoglobulinas IgG o IgA. Mientras que a niveles más bajos (0.2-0.5 ppm) la respuesta celular al parecer es afectada.⁽³⁸⁾⁽⁴⁶⁾

Investigaciones recientes han demostrado que la presencia de aflatoxinas en dietas de pollo de engorda, reduce los niveles de vitamina A séricos, exacerbando las deficiencias de Vitaminas A y E, lo que provoca una mayor susceptibilidad a enfermedades pues se ha visto que existe una relación entre los niveles de Vitamina A y la respuesta inmune del ave.⁽³⁶⁾

También se ha demostrado que las aflatoxinas afectan el metabolismo del calcio y fósforo, al alterar el desarrollo del aparato locomotor favoreciendo la presentación de osteodistrofias. Ya que las aflatoxinas que están presentes frecuentemente en los alimentos en dosis mínimas (0.02 a 0.4 mg/g), son capaces de causar lesiones ultraestructurales en el hígado, interfiriendo con el metabolismo de la vitamina D3, sitio donde dicha vitamina sufre hidroxilación para ser transportada posteriormente a riñón y convertirse en metabolito activo.⁽⁴¹⁾

Las aflatoxinas han sido asociadas también en diversos trabajos a la disminución en la concentración de carotenoides en el plasma, debido a una reducción en la absorción y transporte de pigmentos, lo que origina pollos sin pigmento cutáneo. Los mecanismos de acción son variados:

- El efecto de reducción en la dieta de la concentración de carotenoides a causa del cambio de densidad del contenido intestinal por incremento en las secreciones intestinales.
- Depresión en la habilidad de la mucosa intestinal, para absorber los

carotenoides del contenido intestinal.

- Disminución en la habilidad para transportar carotenoides al suero.
- La acumulación de carotenoides en hígado, se ve alterada sobre todo en forma de diéster.
- La deposición cutánea de carotenoides se afecta, posiblemente por que los pasos enzimáticos que controlan la acetilación de los carotenoides se afecta.⁽⁴⁷⁾
(48)
- Debido a la reducción de la producción de sales biliares, la absorción de las grasas se ve afectada, y por consecuencia la de los pigmentos, provocando una mala pigmentación de la piel del pollo de engorda y de la yema del huevo.⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾

Otro efecto que se ha descrito por algunos autores, para las aflatoxinas sobre las diferentes especies de animales domésticos que la consumen es la reducción en la concentración de hemoglobina y proteínas plasmáticas, disminución de la protrombina sérica alteraciones de los factores de coagulación sanguínea XI y XII, además de, un incremento en la fragilidad capilar aumentando la incidencia de hemorragias en la canal, ocasionando pérdidas económicas por decomisos.⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾

1.7 OCRATOXINAS.

Las ocratoxinas (OA), fueron el segundo grupo de micotoxinas en ser identificadas después de las aflatoxinas. Fueron descubiertas en Sudáfrica en 1965. Las cuales fueron aisladas de cepas de hongos *Aspergillus ochraceus*. Muchas especies de hongos *aspergillus* y *penicillium* son capaces de producir ocratoxinas, pero el principal es *A. ochraceus* y para los del genero *penicillium* los principales productores de OA son *P. verrucosum* y *P. purpurescens*.⁽³⁸⁾

Aunque son capaces de producir siete tipos de toxinas, solo la ocratoxina A ha sido encontrada aproximadamente en un 98% como contaminante natural de granos y semillas. La ocratoxina B y C es muy rara encontrarla como contaminante natural y el resto de las ocratoxinas nunca han sido observadas como contaminantes naturales en granos y semillas.

La ocratoxina A, es una micotoxina mayoritariamente presente en las contaminaciones primarias por mohos de muchos vegetales y de modo particular en cereales y legumbres de regiones geográficas tanto templadas como frías y húmedas. ⁽⁵¹⁾

La contaminación con ocratoxina A es más común en cereales como; cebada trigo, maíz, avena y centeno. La producción de ocratoxina A (OA), puede ocurrir en temperaturas ambientales de hasta 4°C, en granos que contengan de 18.5-40.4% de humedad. ⁽²⁹⁾

Puede considerarse como unas de las micotoxinas mas frecuentes en la contaminación de los granos de cereales, junto a las aflatoxinas y las toxinas del genero fusarium.

La ocratoxina es altamente soluble en solventes orgánicos y solo ligeramente soluble en agua, por lo que su absorción a nivel de membrana ocurre fácilmente. ⁽⁵²⁾

La mayoría de especies de animales estudiadas, presentan una primera y rápida absorción de la ocratoxina en el estómago facilitada por sus propiedades ácidas, seguida de una absorción intestinal lenta, cuando entre la sangre y la luz intestinal se da un gradiente de concentración favorable.

Una de la propiedades toxicocinéticas mas significativa de la OA, es su alta afinidad por las proteínas plasmáticas. Esta unión será determinante de la presencia de la toxina en la sangre y por lo tanto de su toxicidad ⁽⁴⁹⁾

La ocratoxina A, afecta principalmente al riñón, por lo que es considerada una nefrotoxina. ⁽³⁸⁾

A pesar de las diferencias toxicocinéticas encontradas en diversas especies, las lesiones renales en aves, cerdos y roedores son muy similares ⁽⁵⁴⁾

Desde el punto de vista fisiológico, algunos efectos se pueden explicar por el daño en el túbulo contorneado proximal. Parece ser, que la OA puede afectar a diferentes partes de la nefrona dependiendo de las dosis y tiempo de exposición. Durante una exposición aguda sería el túbulo colector la porción más afectada, dando lugar a una alteración en la excreción de los electrolitos. Probablemente, el mecanismo en este caso sea el bloqueo de la conductividad de aniones a través

de la membrana plasmática. En cambio la exposición crónica afecta tanto la hemodinámica renal como la función secretora del túbulo proximal, con un mecanismo en que parece jugar un papel importante la angiotensina II. Tanto por exposición aguda como crónica, la ingesta de OA altera la acidificación urinaria al aumentar el pH de la orina, debido a que la toxina inhibe la reabsorción de HCO₃ (Bicarbonato). ⁽⁵⁵⁾

El efecto de la OA, en las funciones renales de las aves en una exposición aguda causa un incremento en el valor del paquete celular, el cual se refleja en la contracción del fluido extracelular (hemoconcentración y deshidratación). ⁽³⁸⁾

También la ocratoxina tiene un efecto congestivo y hemorrágico, por su efecto antivitaminas K, por lo que inhibe la síntesis de factores implicados en el complejo protombínico, además la OA, disminuye la síntesis proteica en el hígado y por consiguiente la producción de factores plasmáticos de la hemostasia como el fibrinógeno.

Esta inhibición de proteínas es el principal mecanismo de acción implicado en la toxicidad de la OA ya que interfiere con la síntesis de proteínas, DNA y RNA, además afecta al metabolismo de los carbohidratos particularmente la gluconeogénesis.

Debido a que afecta la actividad de la fenilalanina – tRNA sintetasa, una enzima que esta involucrada en el paso inicial de la síntesis de proteínas, esta inhibición de la síntesis de proteínas es la causa primaria de la toxicidad aguda.

Los signos clínicos en una intoxicación aguda se caracterizan por diarrea, postración, anormalidades nerviosas y muerte entre 22 y 25 horas después de la administración de una dosis única oral de 16 mg/kg. Bajo condiciones de campo con bajos niveles en la dieta de ocratoxina A (exposición crónica o subcrónica), los signos clínicos son pobre crecimiento, incremento en el consumo de agua, falla en la pigmentación cutánea y un incremento en la humedad de la cama. ⁽³⁸⁾

El nivel mínimo de OA capaz de reducir la ganancia de peso en pollos en crecimiento aparentemente es 2.0 ppm. Pero se ha reportado una disminución en el peso corporal, un aumento en la conversión alimenticia y un aumento en la mortalidad en pollos que recibieron una dieta con 1.5 ppm de OA por seis

semanas. ⁽³⁸⁾

Además de estos efectos adversos la OA, produce fallas en la pigmentación lo cual es un factor indeseable para el productor. La ocratoxina A produce una hipocarotenoidemia más severa que la causada por la aflatoxina. ⁽³⁸⁾

Ambas micotoxinas, las AF y las OA son extremadamente tóxicas en la avicultura por su interacción entre ellas, ya que su toxicidad es mucho mayor que si se presentaran solas, es por eso una de las razones por las que niveles bajos de aflatoxina en el campo se asocian con grandes efectos en la industria avícola comparado con los estudios de laboratorio en donde este efecto es evaluado individualmente. ⁽⁵⁶⁾

2.1 Justificación.

Estudios que se hicieron en el 2003, demostraron que la presencia natural de micotoxinas en alimentos balanceados y granos empleados en la producción de aves, cerdos y ganado en México, es de 57.05%.⁽⁵⁷⁾ La ingestión de micotoxinas reduce la productividad del pollo de engorda, aumento en la mortalidad de los animales, aumento en los costos veterinarios, falla en la pigmentación, disminución en la calidad y precio de los lotes de grano ocasionando un impacto económico. Se han estimado pérdidas de cerca de 140 millones de dólares en 1986, solo por la disminución en el peso de pollo de engorda que consumieron niveles bajos de micotoxinas en Estados Unidos.⁽³⁶⁾ Por lo tanto este trabajo, pretende ser una herramienta auxiliar en el diagnóstico de fallas de pigmentación ocasionada por micotoxinas, debido a que el diagnóstico de una micotoxicosis es difícil debido a que todos los sistemas orgánicos del animal se ven alterados por las micotoxinas, lo que hace difícil cualquier diagnóstico, y que una mala pigmentación de las canales del pollo de engorda representa un considerable costo para el productor, ya que la suplementación de productos ricos en xantofilas representa un alto costo de producción, el costo por pigmentación representa entre 8 y 10% del costo total de la dieta además de la depreciación de las parvadas.

3.1 Objetivos Generales.

- Analizar el comportamiento de la despigmentación en canales de pollo de engorda, obtenidas de aves alimentadas con altos niveles de aflatoxinas y ocratoxina A, mediante, el estudio de los patrones de los componentes de los pigmentos obtenidos en la técnica de Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en hígado, así como el funcionamiento hepático.
- Analizar el comportamiento de la despigmentación en canales de pollo de engorda, obtenidas de aves alimentadas con altos niveles de aflatoxinas (AF) + ocratoxina A (OA), mediante, el estudio de los patrones de los componentes de los pigmentos obtenidos en la técnica de HPLC en hígado, así como el funcionamiento hepático.

4.1 Objetivos específicos.

- Evaluar el daño hepático causado por la micotoxicosis, mediante el estudio histopatológico del hígado.
- Determinar el daño hepático en aves alimentadas con una dieta contaminada con micotoxinas, mediante la evaluación del funcionamiento hepático a través de la medición de enzimas séricas transaminasa pirúvica glutámica (TGP) y la transaminasa glutámica oxidasa (TGO), proteínas totales y albúmina en sangre.
- Corroborar la falla en la pigmentación de aves alimentadas con una dieta contaminada con micotoxinas (aflatoxinas y ocratoxinas), a través de la evaluación cutánea mediante colorimetría de reflectancia.

5.1 Hipótesis

- La relación entre el funcionamiento hepático y los patrones de los componentes de las xantofilas en el hígado, obtenidos mediante la técnica de CLAR, pueden ser indicativos de diagnósticos de micotoxicosis (aflatoxinas + ocratoxinas A).
- Existe relación entre los patrones obtenidos del hígado, de los componentes de las xantofilas por HPLC y de la evaluación del funcionamiento hepático, con el tipo de lesión histopatológica del hígado y a los valores obtenidos de la medición de la pigmentación cutánea por colorimetría de reflectancia, en una micotoxicosis.

6.1 Material y métodos.

1) La producción de micotoxinas se llevó a cabo bajo la siguiente metodología: Las aflatoxinas se obtuvieron mediante contaminación natural, la cual se realizó, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS), de la Universidad Nacional Autónoma de México. Como sustrato se utilizó Maíz (AS 910 de la empresa Agro Empress), el cual se contaminó con *Aspergillus flavus link* el cual produce aflatoxinas B1 y B2. Se infectaron 27 Kg, de maíz, los cuales se dividieron en 18 frascos de vidrio con 1.5 Kg cada uno, a estos se les agregó 57 ml. de agua destilada con una concentración de conidias de aprox. (10^6 por cada 3 ml) de *Aspergillus flavus link*, y 84 ml. de agua destilada para obtener una humedad del 18%, luego se homogeneizó para que todos los granos quedaran infectados y que toda la solución fuera absorbida por el maíz. Posteriormente se colocó, en una incubadora a 27°C por un periodo aproximado de 45 a 60 días para permitir su crecimiento, pasado este periodo el hongo, se sometió a estrés para que aumentara la producción de sus toxinas, esto se consiguió mediante el descenso de la temperatura (10°C), y condiciones de hipoxia, por 4 días.

La determinación de aflatoxinas se realizó en primer instancia para obtener la cantidad de aflatoxinas totales, y esto se llevó a cabo por medio del método de inmunoafinidad en minicolumna, o (Aflatest y bio - code), el cual consistió en tomar una muestra de 50g del sustrato, a la cual se adicionó 100ml de metanol al 80% y 5g de sal, se licuó por un minuto a alta velocidad, luego se filtró usando papel filtro predoblado y de lo que se recuperó se tomó 1ml, y se le adicionaron 49ml de agua destilada, a la cual se le realizó un segundo filtrado, usando un filtro de fibra de vidrio. Del segundo filtrado se tomó 1ml, el cual se hizo pasar a través de la columna de inmunoafinidad (aflatests) por goteo lento. La toxina se recuperó haciendo pasar 1ml de metanol grado HPLC, para posteriormente agregarle una sustancia

reveladora (comercial) y hacer la determinación de aflatoxina en un fluorómetro (marca VICAM serie 4).

Por último, se realizó una cuantificación por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), y obtener el valor real de la aflatoxina B₁, esta se llevó a cabo en el Laboratorio de Biogeoquímica de la Facultad de Estudios Superiores- Iztacala, con la misma metodología que se llevó a cabo en la cuantificación de la ocratoxina.

6.2 PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA

La producción de ocratoxinas se realizó de la siguiente manera: Se inoculo aproximadamente 1.200 kilos de trigo (previamente esterilizado), con una cepa toxigénica de *Aspergillus ochraceus*, obtenido del laboratorio, de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia -UNAM. Se dividió en 8 frascos con 150 gramos aproximadamente de trigo cada uno.

Se agregaron 500 ml de agua destilada estéril y una suspensión de conideos (9 000 000) por cada 1 kg de trigo, para posteriormente ser incubado a 30°C y con una humedad del 25% por un periodo aproximado de 35 días.

Al igual que en el caso de las aflatoxinas, se realizó en primer instancia una cuantificación de ocratoxinas totales por medio de la técnica de inmunoafinidad en minicolumna, (ocratest), la cual es muy parecida a la técnica utilizada en la cuantificación de las aflatoxinas.

Posteriormente se analizó la cantidad de ocratoxina producida, con la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución esta se llevo a cabo en el laboratorio de Biogeoquímica de la Facultad de Estudios Superiores- Iztacala. Para la cual se tomaron 2g de muestra, previamente homogenizada, a la cual se le añadió 25ml de acetonitrilo + Fase acuosa (ácido sulfúrico al 0.4% + cloruro de potasio al 4%) en una relación 90 : 1, y se agitó por 20 minutos en agitador mecánico orbital a 150 rpm, para posteriormente hacer un filtrado en papel filtro whatman, al filtrado se le agregaron 2ml de agua y

bicarbonato de sodio para alcanzar una concentración de 0.4%. Se le adicionó 15 ml de cloroformo, con lo cual se formaron dos fases una clorofórmica y otra acuosa las cuales se dejaron reposar hasta que se separaron solas y solo se recuperó la fracción clorofórmica en un matraz de bola. A la fracción acuosa se le agregaron 10 gotas de ácido clorhídrico y 15 ml de cloroformo, se separan las fases y la cloroformica se adiciona a la primer fracción en el matraz de bola.

Estas dos fracciones se pusieron a evaporar a sequedad en un rotovapor entre 50 a 60°C, posteriormente se resuspendió con 1ml de metanol, y se hizo una dilución 1 : 20 para poder hacer su lectura en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

6.3 Prueba experimental.

2) Una vez que se contó con la cantidad suficiente de aflatoxinas y ocratoxinas, se procedió a realizar la prueba experimental en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAV), perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Se utilizaron 176 pollos mixtos de 1 día de edad de la estirpe Ross 308, los cuales se distribuyeron en un diseño completamente al azar con 4 tratamientos y 4 repeticiones de 11 pollos cada uno en donde:

Tratamiento 1 testigo sin contaminación (-)

Tratamiento 2 testigo (-) + 500 ppb de aflatoxina B1 (AF)

Tratamiento 3 testigo (-) + 100 ppb de ocratoxina A (OA)

Tratamiento 4 testigo (-) + 500ppb de AF + 100ppb de OA

Las dietas experimentales básicas fueron elaboradas de acuerdo a los requerimientos del NRC, como lo muestra el Cuadro 1. ⁽⁵⁸⁾

La alimentación fue dividida en 2 fases:

Iniciación:(0 -21 días de edad) con 22% de proteína cruda y 3000 kilocalorías de EM/Kg y 30 ppm de xantofilas amarillas de flor de cempasúchil.

Finalización: (22 - 49 días de edad) con 20% de proteína cruda y 3100 kilocalorías de EM/Kg. Y 90 ppm de xantofilas amarillas de flor de cempasúchil.

Cuadro 1. Composición de las dietas basales para pollos de engorda

<i>INGREDIENTES</i>	<i>Iniciador</i>	<i>Finalizador</i>
Sorgo 9 %	543.848 Kg	611.435 Kg
Pasta de Soya 48 %	359.203 Kg	304.368 Kg
Aceite Crudo de Soya	49.474 Kg	39.425 Kg
Fosfato de Calcio	18.673 Kg	16.446 Kg
Carbonato de Calcio	15.35 Kg	13.971 Kg
Sal	4.399 Kg	3.891 Kg
DL - Metionina	2.124 Kg	1.614 Kg
Pixafil**	2 Kg	6 Kg
L- Lisina HCl	1.078 Kg	-
Minerales***	1Kg	1 Kg
Vitaminas***	1 Kg	1 Kg
Cloruro de Colina 60 %	1 Kg	-
Cocciostato	0.5 Kg	0.5 Kg
Bacitracina de Zinc	0.3 Kg	0.3 Kg
Antioxidente	0.05 Kg	0.05 Kg
TOTAL	1,000.00	1,000.00
<i>Análisis Calculado</i>		
Proteína Cruda	22	20
Lisina (%)	1.20	1.05
Metionina (%)	0.58	0.48
Metionina + Cistina (%)	0.90	0.80
Fósforo Disponible(%)	0.50	0.45
Calcio Total (%)	1	0.90
EM (Kcal/ Kg)	3000	3100

**Los niveles de xantofilas de 30 y 90 ppm de xantofilas amarillas se adicionaron con Pixafil
 *** Vitamina A (12000,000 UI), Vitamina D3 (2,500,000), Vitamina E (15,000 UI), Vitamina K (2.0g), Vitamina B1 (2.25g), Vitamina B2 (7.5g), Vitamina B6 (3.5g), Vitamina B12 (20 mg), Ac. Pantoténoico (12.5g), Ac. Fólico (1.5g), Biotina (125 mg), Niacina (45 g), Hierro (50g), Zinc (50g), Manganeso (110g), Cobre (12g).

La alimentación fue a libre acceso durante todo el ciclo productivo. Semanalmente se evaluó, peso corporal, consumo de alimento, conversión alimenticia y la mortalidad fue evaluada mediante la necropsia para determinar la causa de muerte.

Se enviaron muestras de sorgo y pasta de soya al laboratorio previamente para asegurarnos que no contenían las micotoxinas estudiadas por arriba de las normas en las materias primas, y así dosificar las aflatoxinas y las ocratoxinas, que se utilizaron en la elaboración del alimento experimental. Al igual se tomaron muestras del alimento para asegurarnos que la cantidad de micotoxina fuera la correcta.

La evaluación de la pigmentación se realizó a través de los métodos que han demostrado ser precisos, como son la determinación de color a través de instrumentos fotoeléctricos que miden reflectancia.

Por lo que se determinó la pigmentación semanal a partir de la cuarta semana en las aves y hasta la finalización del ciclo productivo, utilizando un colorímetro de reflectancia Minolta CR-400 calibrándolo con plato blanco. La medición se realizó en la zona conocida como vena de la grasa (apterilo lateral). Al finalizar el ciclo productivo (47 días), se tomó una muestra de 5 aves por repetición, las cuales se sacrificaron bajo condiciones comerciales. En estas canales, se evaluó la pigmentación en canales evisceradas (medición en caliente) y después de su salida del tanque de enfriamiento (medición en frío), mediante el colorímetro de reflectancia Minolta en la zona de la vena pigmentante, correspondiente al área de la pechuga. Se realizó también la extracción de xantofilas en el hígado seguidos por concentración de sus componentes, a través de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Para lo cual se obtuvo el hígado (sin vesícula biliar), se pesaron y se maceraron 10 gramos con el mortero, hasta que quedó una muestra homogénea, la cual fue colocada en 30ml de solución "HEAT" (mezcla de solventes = Hexano 10%, Etanol 6%, Acetona 7% y Toluéno 7%), y 2 gramos de sulfato

de sodio, para atrapar la mayor cantidad de grasa en un envase de vidrio cubierto con papel aluminio para evitar que la muestra estuviera expuesta a la luz.

Se esperó 1.5 hrs, para que se realizara la extracción de los pigmentos, transcurrido este tiempo se le agregaron 30 ml de hexano y se dejó reposar por 24 horas hasta que clarificó y se formó la epifase. Se tomaron alrededor de unos 3ml de la epifase para leer en el espectrofotómetro a 474 nm, y obtener de absorbancia de cada muestra y posteriormente cuantificar la cantidad de pigmento en partes por millón de la muestra de hígado.

Se tomaron alrededor de 20 ml más de la epifase y se colocaron en una caja de petri, hasta que se evaporó el solvente.

Quedando una capa amarilla, a la cual se le agregó 1ml de eluente para amarillos (66% de hexano 32% de acetato de etilo y 14% de Isopropanol) para deshacer los pigmentos y se inyectó una muestra en el CLAR, por el método de Perdue Farms. Todas las muestras fueron identificadas con el número asignado de acuerdo al tratamiento, la repetición y el número de ave muestreada.

Una vez que se obtuvieron los cromatogramas, se analizaron los datos obtenidos, para el caso de los ésteres (monoésteres y diésteres), se registraron los picos que aparecieron desde el minuto 1.8 al 6.5 que es el rango en el cual aparecen los picos correspondientes a los ésteres. En el caso de la luteína libre y zeaxantina, se tomaron los picos cuyos tiempos de retención van del minuto 8.1 al 9.6 respectivamente que es el rango en el cual aparecen como lo muestra el Anexo 1.

Todas las áreas de los picos de cada rango de los cromatogramas fueron sumados, para obtener el total de ésteres y el de luteína libre con zeaxantina, de cada repetición, para posteriormente dividir el resultado de la suma de los ésteres entre el resultado de la suma de la luteína libre y zeaxantina, el resultado se utilizó como un factor de relación entre ésteres y luteína libre.

Para determinar el grado de daño a nivel tisular hepático debido a las micotoxinas, se realizó un estudio histopatológico, tomando las muestras de las mismas 5 aves de cada replica, identificando también individualmente las muestras. Para lo cual antes de realizar el macerado de hígado se tomó una muestra de 1cm³, la cual se colocó en una solución de formol al 10%, para su evaluación histopatológica. Por lo tanto cada laminilla correspondió a cada ave y las lesiones a evaluar fueron hiperplasia del epitelio biliar, necrosis hepática, hiperplasia de conductos biliares, necrosis de conductos biliares, degeneración albuminosa y grasa (hepatosis). Estas determinaciones fueron calificadas de acuerdo al grado de severidad con 1 como lesión leve, 2 como lesión moderada y 3 como lesión severa.

Para determinar el daño del hígado en sus funciones enzimáticas debido a la micotoxicosis, se realizó el análisis de la función hepática de las enzimas TGO (Transaminasa Glutámica Oxalacética), TGP (Transaminasa Glutámica Pirúvica), proteínas totales y albúmina. Para lo cual al finalizar el experimento (día 47 de edad), se tomó una muestra de sangre de las mismas aves, la cual se colocó en un tubo sin anticoagulante. Una vez que se separó el suero del coágulo se congeló para conservarlo.

Se tomaron las muestras de suero para la evaluación colorimétrica de acuerdo al método de Wiener laboratorios, el cual sigue los mismos procedimientos para la determinación de TGO y TGP, mientras que posee variaciones para determinación de proteínas totales y albúmina. Para poder hacer la medición los sueros se colocaron en baño maría hasta que se descongelaron, para vaciarlos en tubos limpios e identificados con su clave de tratamiento y replica.

En el caso de la TGO y TGP se hicieron ajustes en la técnica, para poder ocupar menor cantidad de suero, ya que en la técnica original se necesitan 100µl de suero y con el ajuste se utilizaron 50 µl de suero a los cuales se le agregaron 250 µl del reactivo 2-4 DNFH, se mezcló bien y se puso a incubar a 37°C por 10 minutos, transcurrido

este tiempo se agregaron 2.5 ml del diluyente para enzimas se vuelve a mezclar y se espera por 2 minutos para que se lleve a cabo la reacción y poder hacer la lectura de la densidad optica (D.O) en el espectrofotómetro a 505 nm. Para calibrar el espectrofotometro se utiliza una muestra "blanco" la cual lleva los mismos pasos de la muestra, la única diferencia consiste en poner 50 µl de agua destilada en el lugar del suero. Este procedimiento se realizó con cada muestra de suero.

Para la determinación de proteínas totales se tomó una muestra de 50 µl de suero a los cuales se agregan 3.5 ml de reactivo EDTA/Cu, se mezcla y se incuba a 37 °C por 15 minutos, para posteriormente hacer la lectura en el espectrofotómetro a 540 nm, es importante mencionar que esta reacción es estable por 20 minutos, por lo que la lectura de cada muestra no debe de exceder este tiempo.

También se debe de utilizar una muestra "blanco" para calibrar el espectrofotómetro, la cual consiste en 3.5 ml de reactivo EDTA/Cu y 50 µl de agua destilada.

Se debe de utilizar posteriormente una muestra "estandard" la cual consiste en 50 µl de suero patrón (compuesto de albúmina y globulinas en estado nativo con titulo conocido de proteínas Biuret o Kjeldhal) y 3.5 ml de reactivo EDTA/Cu

Para la determinación de albúmina, se utilizarón 10 µl de suero a los cuales se le agregó 3.5 ml de reactivo BCF se mezclo bien y se incubó a 28 °C por 10 minutos. Se realiza la lectura en el espectrofotómetro a 625 nm, esta reacción es estable hasta por 12 horas.

Se requiere también hacer una muestra "blanco" la cual solo lleva 3.5 ml de reactivo BCF (Bromo Cresolsulfon Ftaleína).

También se necesita hacer una muestra estándar la cual lleva 10 µl suero patrón y 3.5 ml de reactivo BCF.

6.4 Análisis estadístico.

La variable productiva peso semanal fue evaluada mediante un análisis de varianza para observaciones repetidas para un modelo completamente aleatorizado.

Para los resultados de la evaluación del índice de conversión, consumo de alimento, pigmentación en frío y en caliente, se realizó un análisis de varianza para un modelo completamente aleatorizado.

Mediante el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta en la j -ésima repetición del i -ésimo tratamiento

μ = media general

T_i = efecto del i -ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = error experimental

Las diferencias entre medias fueron evaluadas con la prueba de Tukey.

Para evaluar la pigmentación en vivo se realizó un análisis de varianza para un modelo de bloque completamente aleatorizado, siendo el bloque la semana mediante el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta en la j -ésima repetición del i -ésimo tratamiento

μ = media general

p_j = efecto del bloque

T_i = efecto del i -ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = error experimental

Para evaluar los resultados obtenidos de las evaluaciones histopatológicas del hígado mediante la prueba de Kruskal Wallis los datos fueron transformados y posteriormente se realizó un Análisis de frecuencias.

Los resultados de las concentraciones de esteres, luteína y zeaxantina (factor), y los resultados de los niveles de Transaminasas en sangre, Proteínas totales y Albumina, fueron transformados mediante la prueba de Box Cox, mediante las siguientes formulas:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Valor Factor}^{-0.2} - 1}{-0.1081697}$$

$$\text{TGO} = \frac{\text{Valor TGO}^{0.8} - 1}{1.15557237}$$

$$\text{TGP} = \frac{\text{Valor TGP}^{0.6} - 1}{1.15565984}$$

$$\text{P. Totales} = \frac{\text{Valor PT}^{1.4} - 1}{1.60650039}$$

$$\text{Albumina} = \frac{\text{Valor Album}^{-0.4} - 1}{-7.9767613}$$

Y posteriormente se les realizó un análisis de Varianza.

Adicionalmente los resultados del HPLC de los componentes de los pigmentos, los resultados de las evaluaciones histopatológicas, de las enzimas del hígado y los resultados de la evaluación de la pigmentación en vivo, frío y caliente se analizaron mediante correlaciones simples.

7.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS.

En el caso de las aflatoxinas cuando se utilizó la técnica de inmunoafinidad en mini columna, se obtuvo un promedio de 31000 ppb de aflatoxinas totales y cuando se realizó la cuantificación de estas por medio de la técnica de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), se obtuvo aproximadamente el 88% aflatoxina B1 y el restante 12% aflatoxina B2, con base a esto se calcularon las dietas de los pollos.

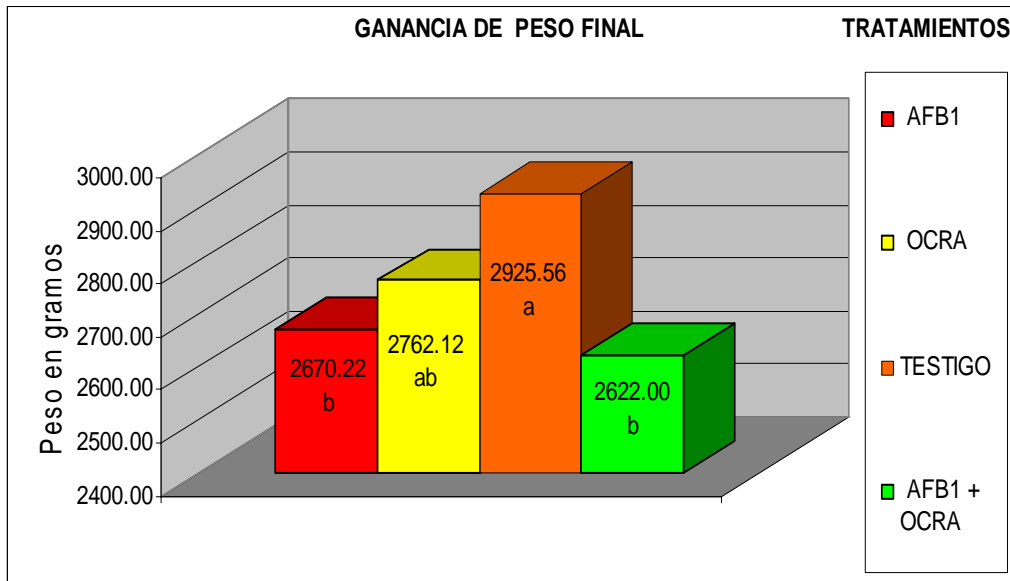
En la cuantificación de las ocratoxinas totales por el método de inmunoafinidad en minicolumna, se obtuvo en promedio 4893.96 ppm, pero cuando se cuantificó por medio de la técnica del CLAR, únicamente el 20% de las ocratoxinas correspondían a ocratoxina A, esto significa que solamente se administraron 100 ppb de OA en la dieta experimental, correspondiendo el resto a otras ocratoxinas

7.2 PARAMETROS PRODUCTIVOS.

Aunque la evaluación de los parámetros productivos no fue uno de los objetivos de esta investigación, si fue una parte esencial para comprender mejor el efecto de las micotoxinas.

Los resultados obtenidos en los parámetros productivos de ganancia de peso, peso semanal, conversión alimenticia y consumo de alimento se observan en el Cuadro 2 respectivamente. Para la variable ganancia de peso, se observaron diferencias estadísticas significativas al finalizar el ciclo ($P < 0.05$) entre el tratamiento testigo de (2925 g), y los tratamientos con la combinación de micotoxinas aflatoxina + Ocratoxinas con (2622 g) y el tratamiento con AFB1 (2670 g). Sin embargo no se detectaron diferencias estadísticas significativas en el tratamiento con ocratoxinas como se puede apreciar la Figura 1.

Figura 1. Ganancia de peso final por tratamiento.



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

Para la variable de peso semanal las diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre tratamientos, se empezaron a observar a partir de la quinta semana, en el tratamiento con la combinación de micotoxinas, siendo éste diferente con el menor peso a todos los demás, esta misma tendencia se repitió en la sexta semana. Sin embargo en la séptima semana el tratamiento testigo mostró, el mayor peso con 2966 gramos siendo diferente al resto de los tratamientos. El tratamiento con ocratoxina fue diferente al testigo y al tratamiento con la combinación de micotoxinas, pero no fue diferente al tratamiento con aflatoxinas. Finalmente el tratamiento con la combinación con micotoxinas no mostró diferencias estadísticas significativas con el tratamiento con aflatoxinas pero si con el resto de los tratamientos, como lo demuestra el Cuadro 3 y la Figura 2.

Estos resultados, demuestran como las aflatoxinas y ocratoxinas por si solas producen un efecto negativo sobre la ganancia de peso como lo reportaron Osborne y Hamilton *et al.* ⁽⁴³⁾ en sus investigaciones con aflatoxinas, observando el efecto negativo de la aflatoxina B1 en la ganancia de peso a diferentes dosis por tres semanas, debido principalmente a la disminución de síntesis de proteínas y de enzimas digestivas. Los resultados obtenidos en la presente investigación,

también coinciden con los informados por Lanza y Washburn *et al.* ⁽³⁷⁾ en donde el peso de las aves se vió disminuido a la tercera semana de manera significativa, además de encontrar una disminución en las proteínas totales en sangre, lo cual es característico en el daño hepático causado por aflatoxinas.

En el caso de la ocratoxina en el presente estudio, se observó un efecto negativo menor en la ganancia de peso de las aves, y solo se encontraron diferencias estadísticas en la ultima semana esto, debido principalmente a que la dosis que se utilizó fue baja, pero se ha observado daño a dosis más altas como lo reportaron Peckham y Douonik *et al.* ⁽⁵⁹⁾ en 1971, notaron que el daño ocasionado por ocratoxinas es más severo que el ocasionado por aflatoxinas debido a que además de provocar un daño severo a los riñones, hay un daño hepático. Resultados parecidos encontraron Doupnik y Peckham *et al.* ⁽⁶⁰⁾ al administrar diferentes dosis altas vía oral de ocratoxina A, encontraron un daño en hígado y riñones y en algunos casos la muerte de todas las aves, después diluyeron la dosis y compararon los diferentes tratamientos y pudieron observar que los tratamientos con las dosis más altas mostraron una supresión considerable en el peso final de las aves.

El tratamiento con la combinación de ambas micotoxinas, fue el que obtuvo el peso final mas bajo en las aves, observandose diferencias estadísticas con los demás tratamientos del presente estudio, pudiendo comprobar el efecto sinérgico de las AF y las OA, como demostraron Huff y Doerr *et al.* ⁽⁶¹⁾ cuando administraron ocratoxina A y aflatoxina B1 a las aves, individualmente y combinadas, pudiendo observar un daño mayor en el peso final de las aves en el tratamiento con la combinación de las dos micotoxinas. Este efecto supresor lo encontraron entre la semana 2 y 3 de edad de las aves .

Cuadro 2. Parámetros productivos promedio de las aves a las 7 semanas.

TRATAMIENTO	Ganancia de peso	Peso final	Consumo de Alimento	Conversión Alimenticia
TESTIGO	2925.5 a ± 86.26	2966.88 a ± 403.51	5537.06 a ± 145.60	1.89 a ±0.02
AFB	2670.2 b ± 27.48	2710.81bc ± 376.76	5167.31 b ± 38.56	1.94 a ± 0.01
OA	2762.1 ab ± 59.22	2802.53 b ± 389.01	5281.73 ab ± 59.64	1.91 a ± 0.04
AFB+OA	2622.0 c ± 14.97	2662.50 c ± 367.45	5079.08 b ± 138.95	1.94 a ± 0.04

± Error Estandar

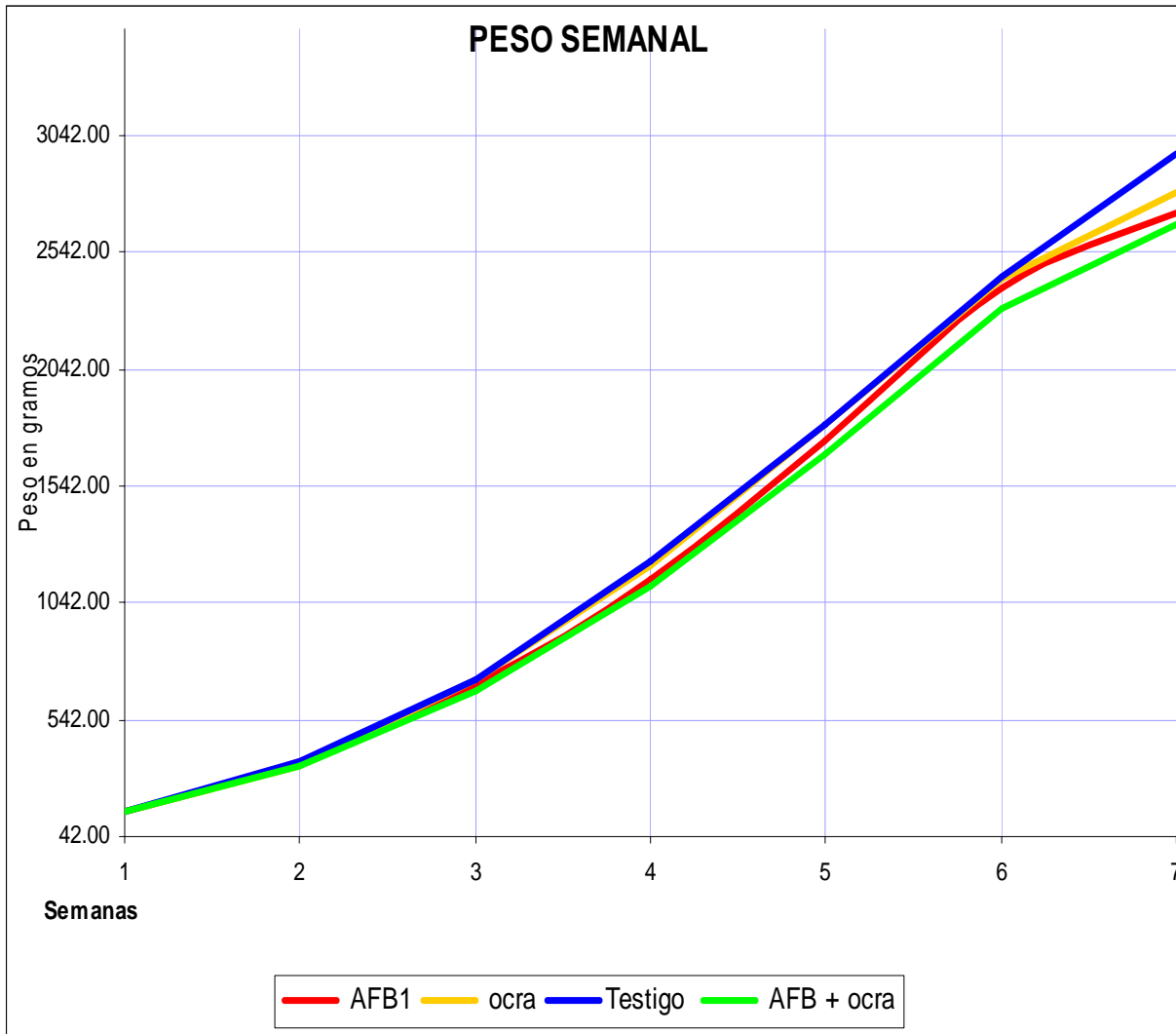
Valores con distinta literal indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)

Cuadro 3. Peso semanal de las aves en gramos por tratamiento.

	SEMANAS						
	1	2	3	4	5	6	7
AF	149.23 a	361.77 a	691.05 a	1147.49a	1734.66ab	2388.51ab	2710.81bc
OA	151.05 a	343.36 a	713.45 a	1201.58a	1809.47 a	2425.51 a	2802.53 b
TESTIGO	150.73 a	361.55 a	717.77 a	1217.34a	1803.75 a	2441.70 a	2966.88 a
AF +OA	144.73 a	348.00 a	663.77 a	1112.68a	1677.95 b	2297.95 b	2662.50 c

Valores con distinta literal indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)

Figura 2 Peso semanal de las aves por tratamiento.



El consumo de alimento mostró diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$) como lo muestra el Cuadro 2, siendo el tratamiento testigo el de más alto consumo de alimento con 5537.06 gramos, siendo diferente al tratamiento con aflatoxinas y al que tenía la combinación de AF + OA los cuales consumieron 5167.3 gramos y 5079.0 respectivamente, con una diferencia de 255.3 gramos con respecto al tratamiento con ocratoxina el cual consumió 5281.7 gramos.

Para la variable conversión alimenticia no se observaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P > 0.05$), como lo muestra el Cuadro 2 pero numéricamente la mejor conversión alimenticia se observó en la dieta testigo (1.89) y la peor (1.94) se registró en el tratamiento con la combinación de

micotoxinas.

Resultados similares obtuvieron Verma *et al.* ⁽⁶²⁾ cuando administraron a diferentes dosis, individualmente y en combinación aflatoxina y ocratoxinas, con lo que pudieron observar una reducción significativa en el consumo de alimento de las aves. Estos autores mencionan que Huff *et al.* 1974⁽⁸⁷⁾ y Kubena *et al.* 1994⁽⁷²⁾ observaron resultados semejantes detectando siempre reducción en el consumo de alimento significativo en tratamientos con dietas con AF y OA individualmente, y en el caso de la combinación de estas fue en donde se encontró el menor consumo de alimento pudiendo comprobar el efecto sinérgico de estas micotoxinas.

En el presente estudio, en el caso de la conversión alimenticia no existió diferencia estadística entre tratamientos, debido a que hubo un menor consumo de alimento y una menor ganancia de peso en los tratamientos con micotoxinas, lo cual coincide con los resultados indicados por Verma *et al* en el 2004.⁽⁶²⁾

7.3 PIGMENTACIÓN.

Los resultados promedio obtenidos en la evaluación de la pigmentación amarilla semanal en vivo, se muestran en el Cuadro 4, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las medias de los tratamientos.

El tratamiento testigo fue diferente estadísticamente a todos los demás con un valor de amarillamiento (b^*) de (24.99) a la séptima semana.

El tratamiento con la combinación de micotoxinas fue diferente con un valor de (19.26) en el amarillamiento de la piel, al tratamiento con ocratoxina (21.96) y una diferencia de más de dos unidades con el tratamiento con aflatoxinas (19.80), como se observa en la Figura 3.

Los resultados de la evaluación de los pigmentos amarillos en la canal, en caliente se muestran en el Cuadro 5, en donde se observa que se encontraron diferencias entre las medias de los tratamientos. Siendo el tratamiento testigo estadísticamente diferente a todos los demás con (43.34). Entre los demás tratamientos no hubo diferencia estadística significativa entre sí, pero el valor más bajo se obtuvo en el tratamiento con la combinación de micotoxinas con (38.17)

Los resultados de la evaluación de la pigmentación amarilla en frío, se muestran en el Cuadro 5, en donde se encontraron diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos. Siendo el tratamiento testigo significativamente mayor con un valor medio de (45.805) al tratamiento de AFB +OA y al de AF, los cuales tuvieron una media de (40.662) y (41.365) respectivamente.

Castañeda *et al.*⁽⁴⁾ en el 2005 obtuvieron valores similares, en la evaluación de la pigmentación amarilla de la piel de aves sanas en vivo, y que consumieron pigmentos naturales, y esto debido a que fue administrada una cantidad menor de pigmento amarillo en la dieta de finalización (80 ppm), y con lo que alcanzo un valor de la pigmentación de la piel de 14. Estos resultados mantienen una similitud con los valores obtenidos en el presente trabajo, en donde el tratamiento testigo obtuvo un valor de 24.99 con 90 ppm. Cabe señalar que se empezó a dar pigmento amarillo desde la etapa de iniciación (día 1 al 21) a un nivel de 30 ppm y en la etapa de finalización (del día 22 al 49) se les administraron 90 ppm, esta diferencia en la cantidad administrada de pigmentos amarillos entre estudios, nos puede ayudar a entender el por que en la diferencia entre este trabajo y el realizado por Castañeda *et al.*

Esta misma tendencia se repitió en los resultados obtenidos en la evaluación de la pigmentación de la piel de las aves sanas, en caliente y en frío por Castañeda *et al.*, ya que en la evaluación en caliente reportaron un aumento en el nivel de amarillamiento de mas 10 unidades y en el presente estudio se obtuvo un aumento de 19 unidades; mientras que en los resultados de la evaluación en frío de este experimento solo hubo un incremento de casi dos unidades y media (43.34 a 45.80) comparado con el de Castañeda *et al.*⁽⁴⁾ en el cual hubo un incremento de cinco unidades (24 a 29), esta diferencia se puede deber al tiempo en se mantuvieron las canales en el tanque de enfriamiento, ya que al haber una contracción de la piel la saturación en los niveles de amarillo se intensifican.⁽⁴⁾

En el caso de los resultados de la evaluación de la pigmentación en vivo, caliente y frío en los tratamientos con micotoxinas, no se ha determinado un valor específico de la disminución de la pigmentación, ya que esto va a depender de la cantidad de micotoxinas consumidas, del tiempo de consumo, del tipo de

micotoxina y de la edad de los animales. Ya que estos son los principales factores que influyen en el nivel de daño que las micotoxinas van a causar en los animales, sin embargo esta disminución de los niveles de amarillamiento de las aves en el presente trabajo coinciden con lo reportado por algunos autores como Tyczkowski y Hamilton ⁽³⁰⁾ reportaron que la disminución de los niveles de amarillamiento en las aves, es debido al daño que existe en la capacidad de absorción, transporte y deposición de los carotenoides contenidos en la dieta sobre todo en el caso de las aflatoxinas.

Algunos autores como Kubena y Phillips *et al* ⁽⁶³⁾ y Osborne *et al* ⁽⁶⁴⁾ consideran que el efecto adverso de la ocratoxina A en la pigmentación de las aves es más severo que el producido por aflatoxina B1, Shaeffer *et al.* ⁽⁴⁷⁾ observaron que la ocratoxina A ocasiona que el contenido intestinal sea más líquido, provocando que los carotenoides que se encuentren en el intestino se diluyan y se produzca una diarrea y como resultado los pigmentos no se absorban. También se ha observado que cuando interactúan las AF y las OA se vuelven extremadamente tóxicas como lo señalaron Campbell *et al.* ⁽⁵⁶⁾ y esta es una de las razones del por que con niveles bajos de aflatoxinas y ocratoxinas en el campo, los efectos son muy grandes y significativos haciendo muy complicado el diagnóstico, como se observó en este experimento que con niveles de 500 ppb de Aflatoxinas y 100 ppb de Ocratoxina A, todos los parámetros productivos se vieron afectados pero sobretodo la pigmentación de las aves. ⁽⁶¹⁾

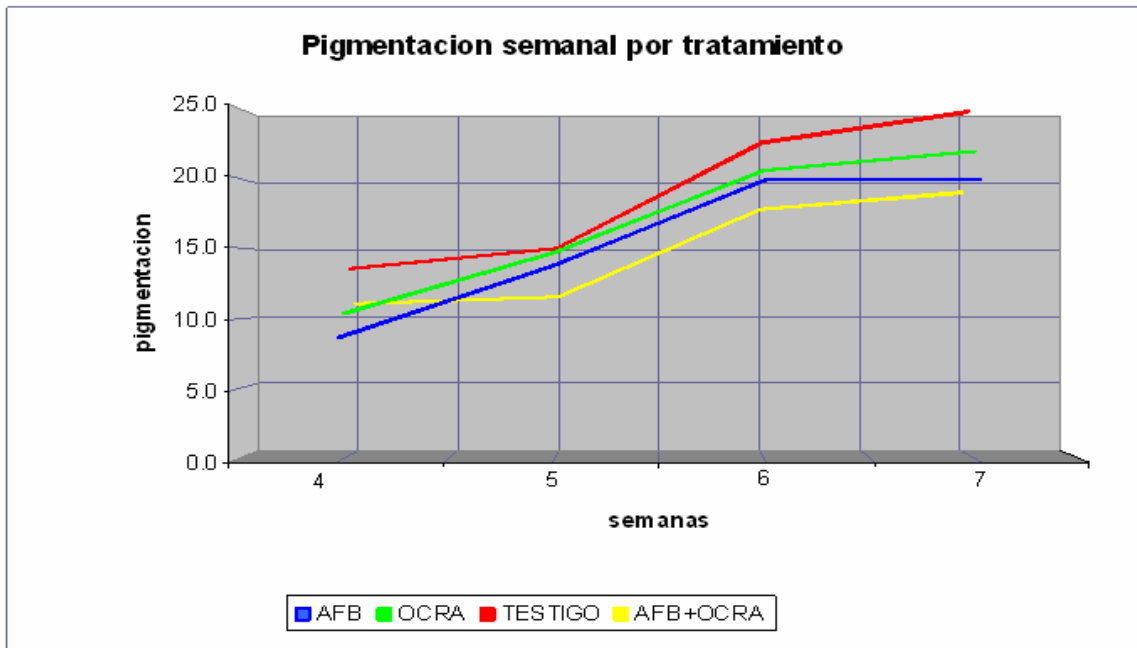
Cuadro 4. Valor de la pigmentación amarilla semanal en vivo por tratamiento y su promedio

SEMANA	AFB	OA	TESTIGO	AFB+OA
Cuarta	8.71	10.40	13.54	11.03
Quinta	13.77	14.76	15.04	11.49
Sexta	19.79	20.6	22.8	18.0
Séptima	19.80	21.96	24.99	19.26
PROMEDIO	15.52 ± 1.28 bc	16.94 b ± 1.24	19.09 a ± 1.35	14.94 c ± 1.01

Valores con distinta literal indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)

± Error estandar

Figura 3. Valor de la pigmentación amarilla en vivo por semana y por tratamiento



Cuadro 5. Valor de la pigmentación amarilla en caliente y en frío de las aves por tratamiento

PIGMENTACIÓN	AFB	OA	TESTIGO	AFB+OA
Caliente	39.91 b ±0.74	40.57 b ±0.67	43.33 a ±0.87	38.17 b ±0.63
Frío	41.36 bc ±0.89	43.91 ab ±0.66	45.80 a ±0.59	40.66 c ±1.03

Valores con distinta literal indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05) ± Error

estandar

7.4 ENZIMAS HEPÁTICAS.

Los resultados de la evaluación de la enzima hepática TGO (Transaminasa Glutámica Oxalacética) se muestran en el Cuadro 6, en donde se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos (P<0.05).

El tratamiento testigo fue significativamente mayor a todos los demás con una media de 17.1 UI. El tratamiento con la combinación de micotoxinas AFB+OCRA fue estadísticamente diferente con una media de 28.0 UI a los tratamientos AFB y al de OA con una media de 61.3 UI y 60.1 UI respectivamente.

En el caso de la TGP (Transaminasa Glutámica Pirúvica) se encontraron diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de los tratamientos. El tratamiento testigo obtuvo un valor significativamente mayor de 19.5 UI siendo diferente al resto de los tratamientos.

El tratamiento con AFB obtuvo una media de 9.3 UI y fue diferente también al resto de los tratamientos, el tratamiento con Ocratoxina mostró una media de 12.7 UI siendo diferente también al resto de los demás tratamientos. Y el tratamiento con la combinación de micotoxinas obtuvo una media de 14 UI siendo diferente también a todos los demás tratamientos como lo muestra el Cuadro 6.

La valoración de los niveles de enzimas en suero es un método, utilizado comúnmente en la medicina para establecer el daño hepático. Cuando hay daño celular hepático estas enzimas salen de la célula dañada, debido a que TGO se localiza en mitocondria y citoplasma del hepatocito, y en otros tejidos como los son corazón y músculo. La TGP también es útil como indicador de daño hepático debido a que se encuentra en el citoplasma del hepatocito, por otro lado, la baja actividad relativa de esta enzima en hígado, es motivo para que algunos autores no la consideren tan sensible para detectar alteraciones hepáticas en aves.⁽⁶⁵⁾

Estudios realizados por Mendoza ⁽⁶⁶⁾ en el 2006 demostraron que aves sometidas a la dieta con 0,07 mg de AFB₁/kg de alimento, presentaron alteraciones hepáticas morfológicas y funcionales a pesar de la baja concentración de toxina suministrada, evidenciándose una aflatoxicosis crónica.

En otros estudios publicados se han obtenido resultados diferentes a los obtenidos en el presente estudio, Bintvihok y Kositharoenkul ⁽⁶⁷⁾ reportaron que al alimentar aves con diferentes dosis de AFB₁, la enzima TGP se incrementó, en todos los tratamientos que recibieron micotoxinas. Aravind *et al* ⁽⁶⁸⁾ en 2003 realizó un estudio con dietas contaminadas con diferentes micotoxinas y a diferentes niveles de inclusión de cada una de ellas, y analizó la función hepática a los 21 días y a los 35 días de edad de las aves, y pudo observar que los niveles de enzimas en sangre varían con la edad ya que a los 21 días de edad los niveles de TGO en los tratamientos con micotoxinas se encontró elevado en comparación con el tratamiento testigo, pero con el transcurso del tiempo estos niveles cambiaron y al día 35 observó que los niveles de TGO en los tratamientos con micotoxinas, disminuyeron en comparación del tratamiento testigo. Y en el caso de TGP sucedió algo similar, ya que en el día 21 de edad de las aves los niveles de TGP en sangre en los tratamientos con micotoxinas era menor que el tratamiento testigo, pero al día 35 todos los tratamientos no eran estadísticamente diferentes.

Algunos estudios, como el realizado por Balachandran y Ramarkrishnan *et al.* ⁽⁶⁹⁾, no observaron diferencia significativa en la actividad sérica de la TGP en pollos sometidos a dietas experimentales con aflatoxinas.

Por lo que se puede sugerir que los niveles de enzimas en sangre pueden variar, dependiendo del tiempo de exposición a la micotoxina, y de la edad de las aves, ya que como se ha visto, si el daño hepático esta iniciando los niveles de enzimas pueden estar elevados y si este daño hepático continua existiendo, con el transcurso del tiempo la síntesis de proteínas se pueden ver afectada, por lo que los niveles de síntesis de enzimas disminuye, sin embargo la valoración de las enzimas hepáticas en sangre sigue siendo un instrumento útil para detectar un daño hepático sobre todo los niveles de TGO.

Se puede sugerir que los niveles elevados de enzimas hepáticas en plasma son indicativos de que existió un daño reciente en las células del hígado, pero estos niveles elevados de las enzimas no aportan información de la función del hígado.

(65)

Cuadro 6. Valor de las enzimas TGO TGP y proteínas plasmáticas en el suero de las aves.

	AFB	OA	TESTIGO	AFB+OA
TGO	61.3 U/I a ±0.02	60.1 U/I a ±0.015	17.1 U/I c ±0.011	28.0 U/I b ±0.019
TGP	9.3 U/I d ±0.074	12.7 U/I c ±0.013	19.5 U/I a ±0.021	14 U/I b ±0.019
Proteínas plasmáticas	0.761 g/dl b ±0.019	0.825 g/dl a ±0.035	0.809 g/dl a ±0.025	0.697 g/dl C ±0.059
Albúmina	0.459 g/dl a ±0.042	0.520 g/dl a ±0.036	0.505 g/dl a ±0.038	0.532 g/dl a ±0.095

Valores con distinta literal indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)

± Error estandar

El valor de las proteínas totales en suero mostraron diferencias estadísticas (P< 0.05) entre tratamientos. El tratamiento Testigo y el tratamiento con ocratoxina

no mostraron diferencias significativas entre ellos con una media de 0.809 g/dl y 0.825 g/dl respectivamente, pero significativamente diferentes al resto de los tratamientos. El tratamiento con AFB fue diferente a todos los demás con una media de 0.761 g/dl y el tratamiento con AFB+OA fue diferente también a todos los demás con una media de 0.697 g/dl como lo muestra el Cuadro 6.

Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores, como Del Bianchi *et al.* ⁽⁷⁰⁾ en el 2005, realizaron un trabajo con pollo de engorda, en el cual alimentaron con diferentes dosis de aflatoxina B1, a partir del día 21 al día 42 de vida de las aves, al finalizar el experimento observaron una disminución en los niveles de proteínas totales en plasma, en los tratamientos que recibieron una dosis de 350 µg / Kg y 2450 µg / Kg de AFB1 en el alimento.

Huff *et al.* ⁽⁷¹⁾ alimentaron por tres semanas a pollos de engorda, con dietas contaminadas con diferentes niveles de AFB1 (0, 1.25, 2.5 y 5.0 ppm), al finalizar el experimento notaron una reducción significativa en los niveles de proteínas plasmáticas, en los tratamientos con 2.5 y 5.0 ppm.

Kubena *et al.* ⁽⁷²⁾ evaluaron el efecto de la ocratoxina a una dosis de 2 mg / kg, la cual fue administrada por 19 días en la dieta de las aves, al finalizar el experimento observaron que existía una disminución significativa en los niveles de proteínas totales en plasma de casi 16% en comparación con el tratamiento testigo.

En general esta reducción en los niveles de proteínas plasmáticas es debido a que las aflatoxinas y las ocratoxinas afectan la síntesis de proteínas.⁽⁷³⁾ En el presente estudio no se detectaron diferencias significativas en el tratamiento con ocratoxinas debido a que la dosis fue baja, sin embargo como ya se ha comprobado si hay un efecto negativo de la ocratoxina en los niveles de proteínas en plasma, debido principalmente a que afecta la actividad de la fenilalanina – tRNA sintetasa, una enzima que esta involucrada en el paso inicial de la síntesis de proteínas.⁽⁷⁴⁾

Y en el caso de las aflatoxinas es principalmente el daño hepático el que ocasiona la disminución de las proteínas plasmáticas, debido a la inhibición de la síntesis de proteínas, principalmente α y β globulinas.⁽⁷⁵⁾

Los valores obtenidos de la albúmina en suero no presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) como lo muestra el Cuadro 6, en donde el valor de la media mas alta lo presento el tratamiento con la combinación de micotoxinas AFB+OA 0.532 g/dl y el valor mas bajo lo obtuvo el tratamiento con AFB con 0.459 g/dl.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Quezada *et al.* ⁽⁷⁶⁾ cuando evaluaron el efecto de la aflatoxina B1 a diferentes dosis (0.5 1.0 y 2.0 μg / g de alimento) en aves adultas y aves en desarrollo por 28 días. Al finalizar el experimento observaron hasta 80% de reducción en la albúmina plasmática en el tratamiento con 2.0 μg AFB1 / g de alimento, y en los tratamientos con la dosis mas bajas no detectaron diferencias estadísticas significativas.

Kubena *et al.* ⁽⁷²⁾ evaluaron el efecto de la ocratoxina A en pollo de engorda, contaminando las dietas con 2.0 mg de ocratoxina A / Kg de alimento, el cual fue administrado a las aves desde el día 1 al 19 de vida de las aves. Al finalizar el experimento observaron una reducción de los niveles de albúmina. Otros autores como Gentles *et al.* ⁽⁷⁷⁾ proporcionaron dosis de 2.5 mg OA / Kg de alimento apollos, por tres semanas y también observaron una reducción en los niveles de albúmina plasmática. Sreemannarayana *et al.* ⁽⁷⁸⁾ han encontrado una reducción significativa de los niveles de albúmina plasmática, a dosis de 1 mg de OA / kg de alimento.

Tung y Donalson *et al.* ⁽⁷⁵⁾ evaluaron el efecto de la ocratoxina A a diferentes dosis (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 μg de OA /g de alimento) por tres semanas y observaron disminución significativa de la albúmina plasmática en todos los tratamientos, incluso en la dosis más baja se encontró una diferencia significativa.

Por lo que se puede sugerir que a dosis más bajas de 625 μg de ocratoxina A y 1.0 mg de AFB1 /Kg de alimento, la síntesis de albúmina no se ve afectada de manera significativa como lo demuestran los resultados del presente estudio.

7.5 CROMATOGRAMAS.

Los resultados del valor de los factores de los monoésteres y diésteres entre la luteína libre se muestran en el Cuadro 7, mostrando que hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre la media de los cocientes (factores) de los tratamientos

La media del tratamiento AFB+OA mostró un valor significativamente mayor (31.78) siendo diferente al resto de los tratamientos. El tratamiento testigo y el de OA fueron similares entre si con un valor de 0.364 y .360 respectivamente, pero diferentes estadísticamente al tratamiento con aflatoxinas que obtuvo un valor 0.770.

El rango de los factores por tratamiento se puede apreciar en el Cuadro 8, en donde los rangos de los tratamientos testigo y el de ocratoxina son muy similares ya que van de 0.14 a 0.48, y en el caso del tratamiento con aflatoxina el valor mas bajo del factor fue 0.57 y el mas elevado 1.39, sin embargo en el tratamiento con la combinación de micotoxinas el rango fue de 2.4 hasta 98.96.

Cuadro 7. Cocientes de las medias de los factores entre Monoésteres Diésteres y luteína en el hígado de las aves por tratamiento.

AFB	OA	TESTIGO	AFB+OA
0.770 b \pm .11	0.360 a \pm .05	0.364 a \pm .03	31.78 c \pm 7.6

\pm Error Estandar

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

Cuadro 8. Rangos de los factores entre Monoésteres, Diésteres y luteína en el hígado de las aves por tratamiento.

AFB	OA	TESTIGO	AFB+OA
0.57 – 1.39	0.18 – 0.48	0.21 – 0.48	2.4 – 98.96

En estudios realizados por Tyczkowski y Hamilton ⁽⁷⁹⁾ observaron que la aflatoxina altera la composición en la mezcla de oxicarotenoides en el contenido intestinal además de que provoca un daño en la absorción de la luteína dentro del torrente sanguíneo, lo que causa un secuestro de la luteína en el hígado en formas poco disponibles como monoésteres y diésteres y como consecuencia disminuye la cantidad de luteína depositada en la piel. Utilizando diferentes dosis de aflatoxina (0, 1, 2, 4 y 8 µg /g de alimento) encontraron que en las aves libres de aflatoxinas depositaron en mayor cantidad la luteína en el hígado en forma de luteína libre, seguida por los monoésteres y diésteres. Pero en los tratamientos con aflatoxinas aumentaron la acumulación de la luteína en forma de monoésteres casi cuatro veces y en forma de diésteres casi 12 veces más que el tratamiento control.

Hamilton ⁽²⁴⁾ (1992), observó que las aflatoxinas causan una disminución de 25% de luteína en el contenido del hígado pero un incremento de 3.5 veces más de monoésteres de luteína y 10 veces más de diésteres de luteína. Y este secuestro de luteína en el hígado en formas esterificadas provoca una falla en el transporte a los tejidos contribuyendo a una falla en la pigmentación. Teóricamente esta falla en la pigmentación es el resultado de un daño en la acumulación, absorción, transportación y deposición de los carotenoides o por un aumento en la excreción de los carotenoides.

Los efectos negativos de las aflatoxinas en la esterificación de la luteína en el hígado refuerza la teoría de que el efecto causado en la mala pigmentación por diferentes agentes puede ser diferenciadas por el análisis de los tejidos por HPLC.

⁽⁸⁰⁾

Schaeffer *et al.* ⁽⁴⁷⁾ estudiaron el efecto negativo de la ocratoxina A en la pigmentación del pollo de engorda, administrando diferentes dosis de ocratoxina A (0,0 .5, 1.0 2.0 y 4.0 µg /g de alimento) por tres semanas. Al finalizar el

experimento observaron una disminución de 75% del total de carotenoides en el hígado con la dosis de 4.0 µg /g de alimento, pero los diésteres de luteína se incrementaron de manera significativa en todos los tratamientos incluyendo la dosis mas baja de 0.5 µg /g de alimento siendo todos de manera significativa.

Con base en estos resultados, se determinó la relación que existe entre ésteres y luteína libre en el presente estudio, y se puede sugerir que en el caso de una aflatoxicosis, el valor del factor debe de estar por arriba de 0.5 y como máximo 1.5,

En la combinación de AF+ OA debe de estar como mínimo arriba de 2 y un máximo de 100. Y en los tratamientos en donde no hay efecto de una micotoxicosis y los valores son normales deben de estar debajo de 0.5

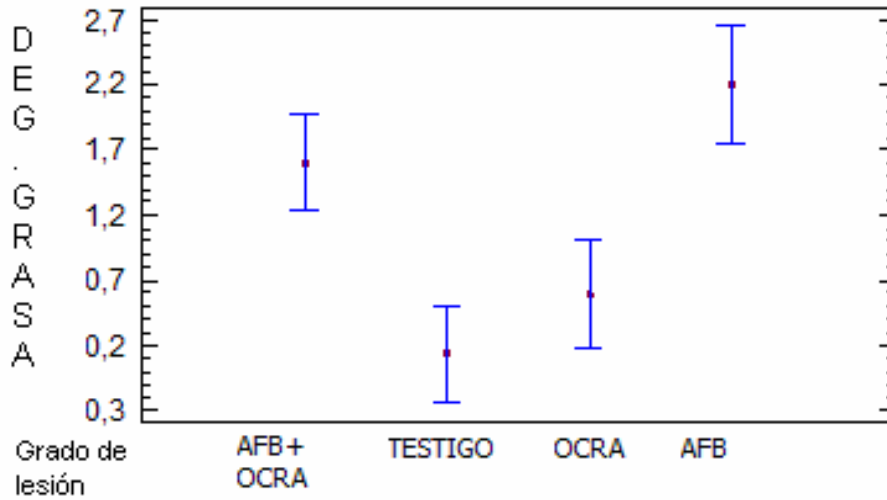
7.6 LESIONES HISTOLÓGICAS.

Los resultados de las lesiones histológicas, que corresponde a cambios degenerativos se muestran en el Cuadros 9 y en las Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10

En el Cuadro 9 se puede observar que hubo diferencia estadística en degeneración grasa, para el tratamiento AF y para la combinación de micotoxinas AF+OA los cuales no fueron estadísticamente diferentes entre si con una media de (2.2) y (1.6), pero diferentes a los tratamientos testigo y al de ocratoxina que tuvieron una media de (0.133) y (0.58) como lo muestra la Figura 4.

La evaluación histopatológica para necrosis del parénquima hepático se muestran en el Cuadro 9, en donde se detectaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) para la combinación de micotoxinas AF+OA la cual fue diferente con una media de (1.46) al tratamiento Testigo y al tratamiento con OA los cuales tuvieron una media de (0.26 y 0.33) respectivamente (Figura 5).

Figura 4 Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado de las aves para degeneración grasa por tratamiento



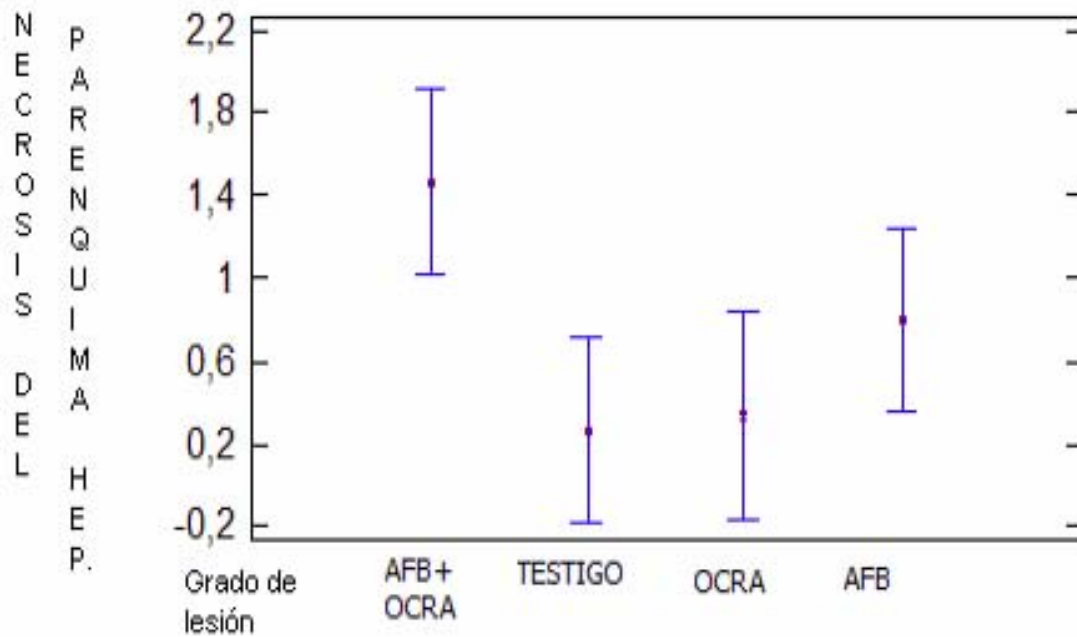
Cuadro 9. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado de las aves para degeneración grasa por tratamiento

Lesiones	AFB	OA	TESTIGO	AFB+OA
Degeneración grasa	2.20 a ± .30	0.58 b ± .19	0.133 b ± .090	1.60 a ± .27
Necrosis del parénquima	0.8 ab ± .20	0.33 b ± .22	0.26 b ± .20	1.46 a ± .32
Hiperplasia de epitelio biliar	0.46 b ± .19	0.91 c ± .25	0.0 a ± 0.0	0.86 c ± .23
Hiperplasia de conductos biliares	1.3 a ± .14	1.5 a ± .09	0.13 b ± .27	1.8 a ± .13
Necrosis de conductos biliares	0.6 a ± .21	0.3 b ± .18	0.0 c ± 0.0	1.13 a ± .29
Infiltrado de linfocitos	1.0 a ± .21	0.5 b ± .23	1.0 a ± .16	1.6 c ± .15
Infiltrado de heterófilos	1.13 b ± .37	2.25 c ± .13	0.13 a ± .09	2.06 c ± .30

Valores con distinta literal indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)

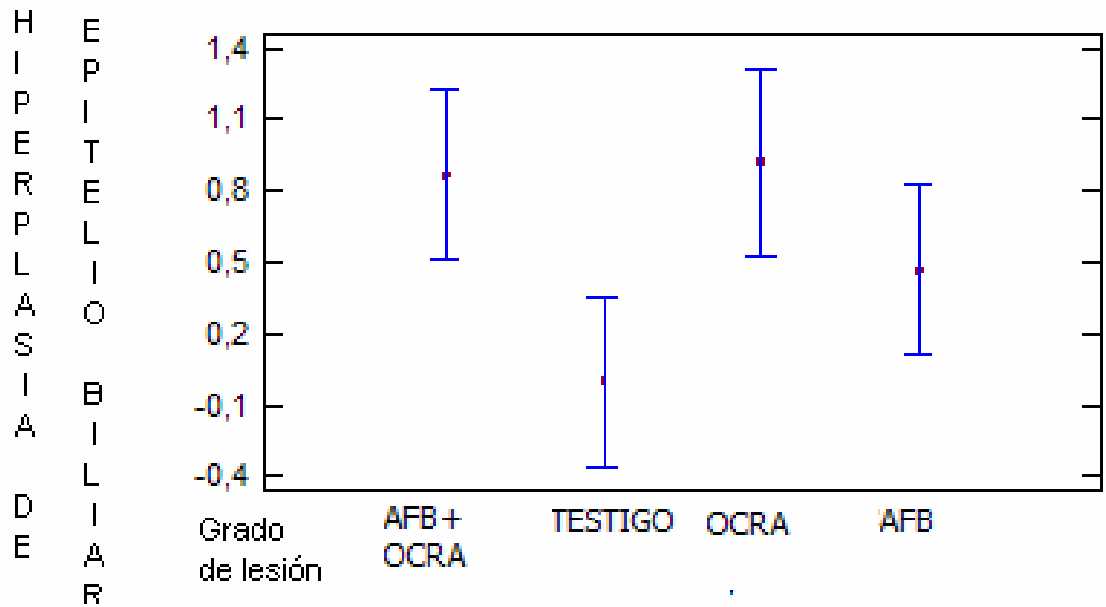
Error estandar ±

Figura 5. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado de las aves para necrosis del parénquima hepático por tratamiento



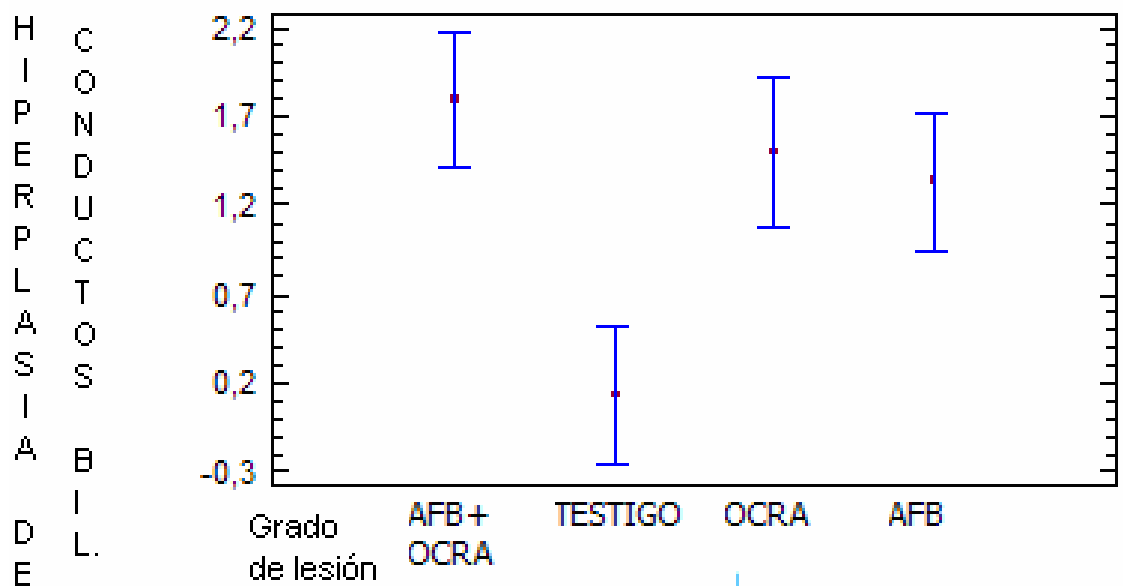
Los resultados para la hiperplasia del epitelio biliar se muestran en el Cuadro 9, y en la Figura 6, en donde el tratamiento testigo fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) con una media de (0.0) a los demás tratamientos, los tratamientos con OA y el tratamiento AFB+OA fueron iguales entre sí con una media de 0.91 y 0.86 respectivamente, pero diferentes al tratamiento con aflatoxina el cual tuvo una media de 0.46.

Figura 6. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado para hiperplasia de epitelio biliar por tratamiento



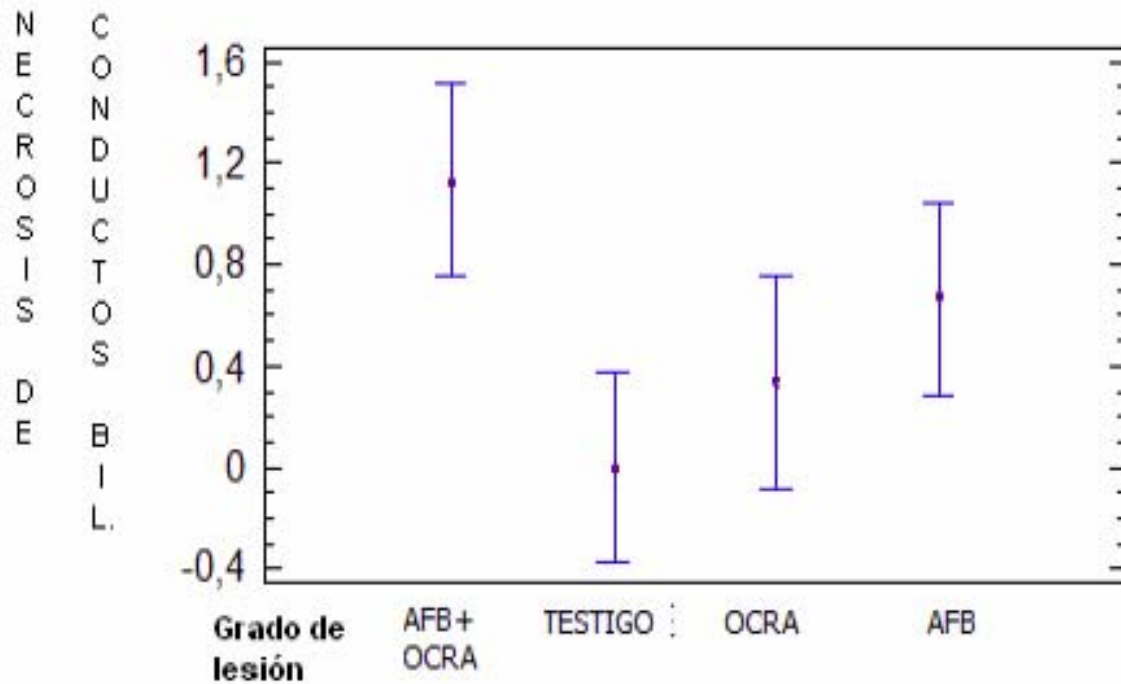
Los resultados para hiperplasia de conductos biliares se muestran en el Cuadro 9 y en la Figura 7 en donde el tratamiento testigo fue diferente estadísticamente ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos con una media de 0.133. Los tratamientos restantes no diferentes entre si.

Figura 7. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado para hiperplasia de conductos biliares por tratamiento.



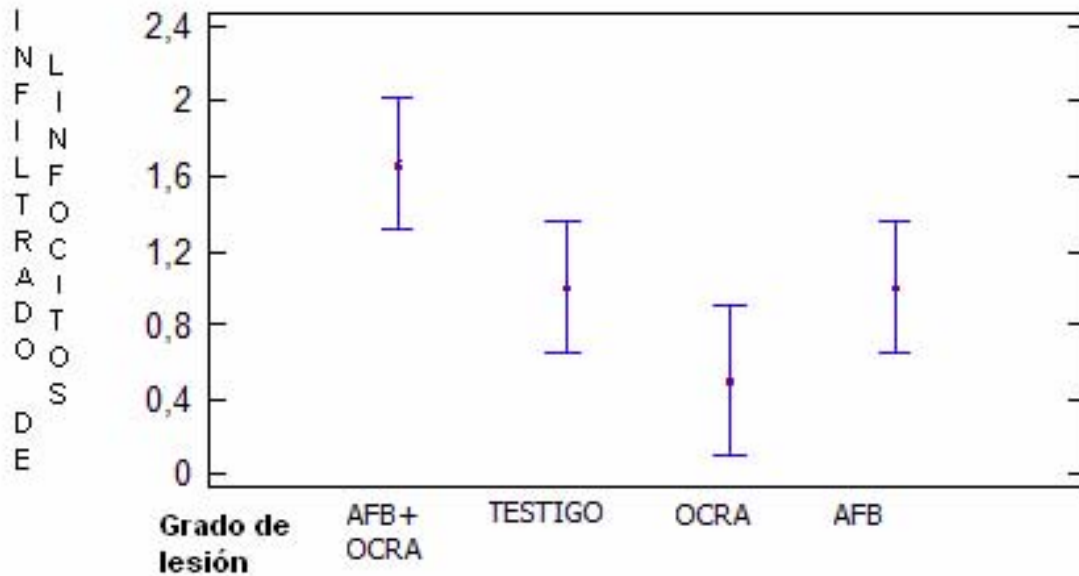
En los resultados para necrosis de conductos biliares se encontró que el tratamiento con la combinación de micotoxinas fue significativamente mayor a los tratamientos testigo y al de Ocratoxinas como lo muestra el Cuadro 9 y la Figura 8.

Figura 8. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado para necrosis de conductos biliares por tratamiento.



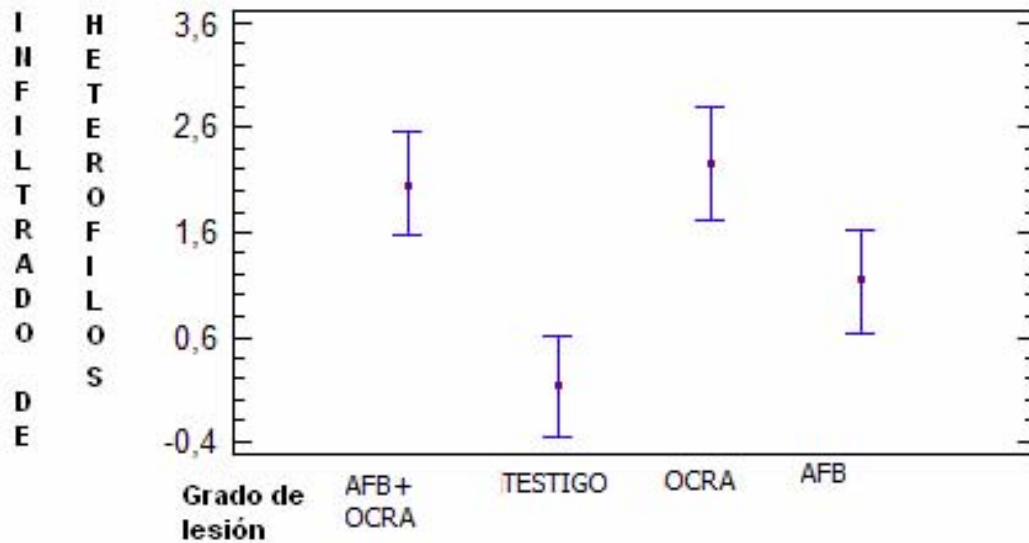
En el infiltrado linfocitario hubo diferencias estadísticas ($P < 0.05$), siendo el tratamiento con la combinación de micotoxinas AFB+OA diferente a todos los demás con una media de 1.6 y los tratamientos con AFB y testigo no fueron diferentes entre si con una media de 1.0 respectivamente, pero si fueron diferentes al tratamiento con OA con una media de 0.5 como lo muestra el Cuadro 9 y la Figura 9.

Figura 9. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado para infiltrado linfocitario del espacio porta por tratamiento.



En el infiltrado de heterófilos el tratamiento testigo mostró el valor significativamente menor P ($0. < 0.05$) al resto de los tratamientos con una media de 0.13. También el tratamiento con AFB fue diferente a todos los demás con un media de 1.13, mientras que los tratamientos AFB+OA y OA no mostraron diferencia significativa entre si, como lo muestra el Cuadro 9 y la Figura 10.

Figura 10. Resultados de las evaluaciones histopatológicas de hígado para infiltrado de heterófilos en el espacio porta por tratamiento.



Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores como Ortatli observó los daños ocasionados por aflatoxina B1 a dosis mas bajas (100 y 50 ppb) en aves alimentadas con dietas contaminadas con AFB1 durante 42 días. Al finalizar el experimento en el tratamiento con 100 ppb encontraron degeneración grasa en el 80% de las muestras observadas. Esta degeneración grasa es causada, como ya se ha visto por una incapacidad del hígado para movilizar las grasas, por la falta de proteínas transportadoras. ⁽⁸¹⁾

Karaman et al. evaluaron el efecto de la aflatoxinas en aves por tres semanas. Al finalizar el experimento realizaron estudios histopatológicos del hígado, y observaron que los tratamientos que recibieron AFB1, todos tenían degeneración grasa. También en estos tratamientos se observó hiperplasia de conductos biliares, infiltrado de linfocitos y en algunos casos necrosis de conductos biliares y necrosis hepática. ⁽⁸²⁾

Tessari *et al.* ⁽⁸³⁾ administraron diferentes dosis de aflatoxina (0,50 y 200 µg / Kg) desde el día 8 de edad al 41. Las aves que recibieron 50 µg AFB al finalizar el experimento, observaban degeneración vacuolar, hiperplasia de conductos

biliares, infiltrado de heterófilos y linfocitos. Y los tratamientos que recibieron 200 µg AFB1, además de las lesiones encontradas en el tratamiento con 50 µg necrosis de hepatocitos y de conductos biliares. Estos mismos resultados han sido reportado por otros autores como Newberne ⁽⁸⁴⁾ administro aflatoxina B1 en diferentes dosis (250 µg a 500 µg /Kg) a pavos por varias semanas y observo hígado graso, hiperplasia de epitelio biliar y necrosis de hepatocitos. Giambrone *et al.* ⁽⁸⁵⁾ observaron que a concentraciones de 500 y 1000 µg de AFB1 / Kg de alimento, causaba hiperplasia de conductos biliares y degeneración vacuolar.

Las lesiones ocasionadas por ocratoxinas son muy similares a las ocasionadas por aflatoxinas, como lo comprobaron Santin *et al.* (2002) cuando alimentaron aves con ocratoxinas, por 42 días. Al finalizar el experimento observaron vacuolización de hepatocitos, hiperplasia de conductos biliares, hiperplasia de epitelio biliar y acumulación de células linfocitarias.⁽⁸⁶⁾

Otros autores como Huff *et al.* ⁽⁸⁷⁾ reportaron lesiones similares, además de degeneración grasa.

En general los resultados obtenidos en el presente trabajo, coinciden con lo reportado por otros autores. En el caso del tratamiento con ocratoxinas no se encontraron diferencias significativas, comparado con el tratamiento testigo, y esto se puede deber a que la dosis de ocratoxina utilizada fue muy baja. Pero en contraste se puede observar el efecto sinérgico de la aflatoxina y la ocratoxina en la intensidad de las lesiones.

Los resultados del análisis de frecuencias se muestran en los Cuadros 10, 11 y 12.

El Cuadro 10 muestra los resultados de las lesiones a los conductos biliares, que con más frecuencia se presentaron por tratamientos.

En el tratamiento con aflatoxinas las principales lesiones fueron: Hiperplasia de conductos biliares con 53% moderado y 26% leve, hiperplasia de epitelio biliar 20% leve y Necrosis de conductos biliares 26% con un grado de lesión leve y 20% con moderado.

En el tratamiento con ocratoxinas la lesión principal fue la hiperplasia de conductos biliares con 46 % con un grado de lesión leve, hiperplasia de epitelio

biliar con 26% con grado de lesión moderado y 13% de necrosis de conductos biliares con grado leve 6% moderada.

En el tratamiento testigo la única lesión presentada fue hiperplasia de conductos biliares con 13% de frecuencia y grado de lesión leve.

En el tratamiento con la combinación de micotoxinas las principales lesiones fueron: hiperplasia de conductos biliares con 46.67% moderada y 33% severa, hiperplasia de epitelio biliar 33% moderada y necrosis de conductos biliares en todos los grados de lesión: 20% leve 26% moderado y 13% severo.

Cuadro 10. Análisis de frecuencias para las evaluaciones histopatológicas de los conductos biliares

TRATAMIENTO	Hiperplasia de conductos biliares			Hiperplasia del epitelio biliar			Necrosis de conductos biliares		
	LEVE	MODERADO	SEVERO	LEVE	MODERADO	SEVERO	LEVE	MODERADO	SEVERO
AFB	(4 /15) 26.66%	(8/15) 53.33%	0	(3/15) 20%	(2/ 15) 13.33%	0	(4/ 15) 26.66%	(3/15) 20%	0
OCRA	(7/15) 46.67%	(4/ 15) 26.66%	(1/15) 6.66%	(3/15) 20%	(4/ 15) 26.66%	0	(2/ 15) 13.33%	(1/15) 6.66%	0
TESTIGO	(2/ 15) 13.33%	0	0	0	0	0	0	0	0
AFB+OCR	(1/15) 6.66%	(7/15) 46.67%	(5 /15) 33.33%	(3/15) 20%	(5 /15) 33.33%	0	(3/15) 20%	(4/ 15) 26.66%	(2/ 15) 13.33%
n= 15									

Los valores están expresados como porcentaje de presentación de lesiones, siendo la n por tratamiento de 15 observaciones.

En el Cuadro 11 se presenta el análisis de frecuencia de presentación de lesiones degenerativas del hígado por tratamiento. En el tratamiento con aflatoxinas las lesiones principales fueron: necrosis hepática 40% leve y 20 % moderada, degeneración grasa en todos los grados de lesión 20% leve, 26% moderada y 20% severa.

En el tratamiento con ocratoxinas las lesiones principales fueron degeneración grasa leve con 33% y necrosis hepática moderada 13%.

La lesión más significativa en el tratamiento testigo fue la degeneración grasa leve con 13% en la frecuencia de presentación.

En el tratamiento con la combinación de micotoxinas las lesiones se presentaron en todos los grados de daño, para necrosis hepática fue de 13% leve 26% moderado y 33% severa. En degeneración grasa fue 20% leve 40% moderado y 20% severa.

Cuadro 11. Análisis de frecuencias de presentación, para las evaluaciones histopatológicas de las lesiones degenerativas del hígado

TRATAMIENTO	Necrosis hepática			Degeneración grasa		
	LEVE	MODERADO	SEVERO	LEVE	MODERADO	SEVERO
AFB	(6/ 15) 40%	(3/15) 20%	0	(3/15) 20%	(4/ 15) 26.66%	(3/15) 20%
OCRA	0	(2/ 15) 13.33%	0	(5 /15) 33.33%	(2/ 15) 13.33%	0
TESTIGO	(1/15) 6.66%	0	0	(2/ 15) 13.33%	0	0
AFB+OCR	(2/ 15) 13.33%	(4/ 15) 26.66%	(5 /15) 33.33%	(3/15) 20%	(6/ 15) 40%	(3/15) 20%
n= 15						

Los valores están expresados como porcentaje de presentación de lesiones, siendo la n por tratamiento de 15 observaciones.

Los resultados del análisis de frecuencias, de los infiltrados celulares se muestran en el Cuadro 12, en donde se puede apreciar que en todos los tratamientos existió infiltrado celular.

En el tratamiento con aflatoxinas hubo infiltrado linfocitario leve y moderado con 33%, además de un infiltrado de heterófilos severo con 33%. En el tratamiento con ocratoxinas existió un infiltrado de linfocitos leve y moderado con 13% cada uno. Además un infiltrado severo de heterófilos con 20%, moderado con 60% y leve con 6%. En el tratamiento testigo se observó un infiltrado de linfocitos leve y moderado con 20% de frecuencia cada uno. En el caso del infiltrado de heterófilos

hubo un 13% de frecuencia con un grado leve.

En el tratamiento con la combinación de micotoxinas existió un infiltrado de linfocitos leve con 40%, moderado con 53% y severo con 6%. Además de un infiltrado de heterófilos moderado con 33% y severo con 46%.

Cuadro 12. Análisis de frecuencias para los infiltrados hepáticos de linfocitos y heterófilos

TRATAMIENTO	Linfocitos			Hetero-filos		
	LEVE	MODERADO	SEVERO	LEVE	MODERADO	SEVERO
AFB	(5 /15) 33.33%	(5 /15) 33.33%	0	0	(1/15) 6.66%	(5 /15) 33.33%
OCRA	(2/ 15) 13.33%	(2/ 15) 13.33%	0	(1/15) 6.66%	(9 /15) 60%	(3/15) 20%
TESTIGO	(3/15) 20%	(3/15) 20%	0	(2/ 15) 13.33%	0	0
AFB+OCR	(6/ 15) 40%	(8/15) 53.33%	(1/15) 6.66%	0	(5 /15) 33.33%	(7/15) 46.67%
n= 15						

Los valores están expresados como porcentaje de presentación de lesiones, siendo la n por tratamiento de 15 observaciones.

Los resultados de las correlaciones simples se muestran en el anexo 2 en donde se puede apreciar las correlaciones estadísticamente significativas entre las variables de cada tratamiento.

8.1 Conclusiones.

Los efectos tóxicos de 500 ppb de Aflatoxina B1 y 100 ppb de Ocratoxina A, fueron visibles en cuanto a ganancia de peso y consumo de alimento.

El efecto negativo de 100 ppb de Ocratoxina A en el peso de las aves fue estadísticamente significativo en la séptima semana. Y el efecto de 500 ppb de aflatoxina B1 desde la quinta semana de vida de las aves.

Se aprecia efecto sinérgico de las aflatoxinas y la ocratoxinas, en la ganancia de peso, a 49 días.

El consumo de alimento fue afectado de manera grave, ya que se detectaron 458 gramos de diferencia entre el tratamiento testigo y el de la combinación de micotoxinas.

En la evaluación de la pigmentación en vivo, se observó el efecto de la aflatoxinas, ocratoxinas y la combinación de micotoxinas, ya que a la séptima semana se observó una diferencia de 5 unidades, 3 unidades y 5.7 unidades de amarillamiento respectivamente, comparado con el tratamiento testigo.

La evaluación en caliente y frío de la pigmentación, mostró los efectos negativos de la aflatoxinas, ocratoxinas y la combinación de ambas micotoxinas; lo que es importante ya que aves que no alcanzan como mínimo 42 unidades de amarillamiento en la canal, sufren un castigo en el precio en el mercado.

El uso de la Enzima TGO para diagnosticar daño hepático causado por micotoxinas, es muy útil y significativa como lo demostraron los resultados del presente estudio, ya que se comprobó que en lesiones hepáticas los niveles de esta enzima se elevan de manera significativa.

En casos de aflatoxicosis y ocratoxicosis los niveles de proteínas plasmáticas se reducen de manera significativa, debido principalmente a la reducción de α β globulinas, por el efecto inmunosupresor de estas.

A niveles de 500ppb de aflatoxina B1 y 100 ppb de OA los niveles de albúmina plasmática no se afectaron.

El factor que existe en la relación entre los ésteres y luteína libre en hígado, ayuda a diagnosticar una aflatoxicosis y la combinación de AFB1+OA ya que en el

caso de aflatoxicosis, el valor del factor debe de estar entre 0.5 y como máximo 1.5, en la combinación de AFB1+ OA debe de estar como mínimo en 2 y un máximo de 100, y en los tratamientos en donde no hay una micotoxicosis y los valores son normales, deben de estar debajo de 0.5.

Los estudios de los cambios histológicos en hígado son una herramienta útil para evaluar los efectos tóxicos de las aflatoxinas y locratoxinas ya que ayudan a complementar los resultados de la evaluación del funcionamiento hepático por medio de las enzima heptaicas como la Transaminasa Glutamica oxalacetica TGO.

9.1 LIETERATURA CITADA:

1. Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2005. Unión Nacional de Avicultores, Dirección de Estudios Económicos.
2. Sunde M. The scientific way to pigment poultry products. Poultry Sci. 1992: 71; 709-710.
3. Tyczkowski J, Hamilton B. Absorption, transport and deposition in chickens of lutein diéster, a carotenoide extracted from marigold (*tagetes erecta*) petals. Poultry Sci. 1986:65;1526-1531
4. Castañeda MP,Hirschler EM, Sams AR. Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments. Poultry Sci. 2005:84; 143-147.
5. Williams D. Origin and impact of color on consumer preference for food, Poultry Sci 1992: 71; 744-746.
6. Ávila GE. Pigmentantes en la avicultura. en: anabólicos y aditivos en la producción pecuaria. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México, AC. 1990: 239-250.
7. Tirado FJ. Evaluación de la capacidad pigmentante en pollos de engorda, de dos productos altos en zeaxantina provenientes de flor de cempasuchil. Universidad de Colima, Posgrado interinstitucional en ciencias pecuarias. 1999; 2-24
8. Schiedt, K, Absortion, retention and metabolic transformation of carotenoids in chicken, salmonids and crustacea. Thesis for the doctor thecnicar degree. Norwegian institute of Technology. University of Trondheim, Switzerland, 1987
9. Braverman JBS. Introducción a la bioquímica de los alimentos. 1980. Cap12 :207-218.
10. Viliesid F. Sobre la naturaleza de los pigmentos carotenoides. Boletín técnico No 1. industrias ALCOSA, 1999.
11. Britton G ,Liaaen-Jensen S. Carotenoids: Biosynthesis and metabolism. 1998. Chapter 7: 286-357.
12. Tyczkowski J, Hamilton PB. Altered metabolism of carotenoids during aflatoxicosis in young chickens. Poultry Sci. 1987: 6; 1184-1188

13. Vicente S J L. Diplomado en producción avícola. Nutrición y alimentación avícola. Segunda edición 2001: 145:157.).
14. Fernández S. Pigmentación en la avicultura. Industrias Roche, Diplomado en Producción Avícola, UNAM. 2001; 150-157
15. Fernández, S. Pigmentación en la agricultura. Memorias de Simposio Aditivos empleados en la alimentación animal y sus implicaciones en la salud pública, México, 2002
16. Breithaupt DE, Sèller P. y Grashorn M.A. Quantification of Carotenoids in chicken plasma after feeding free or esterified lutein and capsanthin using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis. Poultry Sci. 82: 395-401, 2003.
17. Tyczkowski J, Hamilton PB Absorption transport and deposition in chickens of lutein diester carotenoid extracted from marigold tagetes erecta petals Poultry Science 65: 1526-1531, 1986
18. Middendorf DF, Childs GS, Cravens WW. A rapid bioassay for the comparison of xantopyll availability from various sources. Poultry Sci 1980: 59; 1442-1454
19. Becerril GM. Evaluación del poder pigmentante de luteína y capsantina en pollo de engorda y gallinas de postura con un colorímetro de reflectancia. (Tesis de Maestría) México DF. Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia 1989.
20. Tirado FJ. Pigmentos y pigmentación. X Ciclo de conferencias Internacionales Sobre Avicultura, AMENA: 1991; 181- 197
21. Becerril GMJ. Pigmentación con luteína y capsantina en pollos de engorda y huevo. I, II, III. Tec. Avipec 1988-1989; No 10,11,12.
22. Janky DM. The use of the minolta Reflectance Chromameter IITM. For pigmentation evaluation of broiler shanks. Poultry Sci 1986: 65;491-496
23. Piraces SF, Cortes CR. Factores que afectan la pigmentación de pollo de carne. Productos ROCHE. X Ciclo de conferencias internacionales sobre avicultura, AMENA: 1991; 103-127.
24. Hamilton PB. The use of high performance liquid chromatography for studying

- pigmentation. Poultry Sci. 1992:71;718-724
25. Cortés CR, Leal MJ. La medición de la intensidad del color de la piel del pollo de engorda. Tec. Avipec 1997: 109; 38-39
 26. Schaeffer LJ, Hamilton PB. Effect of dietary lipid on lutein metabolism during aflatoxicosis in young broiler chickens. Poultry Sci. 1990:69;53-59
 27. Fletcher DL, Papa CM, Tirado FX. The effect of saponification on the broiler coloring capability of marigold extracts. Poultry Sci 1977; 56:86-90.
 28. Hencken H. Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. Poultry Sci. 1992:71;711-717
 29. Borja V. Factores que afectan a la pigmentación natural en avicultura. Selecciones Avícolas Mayo 1997: 276-279.
 30. Tyczkowski J, Hamilton PB. Altered metabolism of carotenoids during aflatoxicosis in young chickens. Poultry Sci. 1986:66;1184-1188
 31. Jelinek CF, Pohland AE. Worldwide occurrence of micotoxins in foods and feeds-an update. Journal.Assoc. Off. Anal.Chem. 1989 72: 223-230
 32. Devegowda G, Swamy HV. Mycotoxin Picture worldwide: Novel Solutions for their counteraction. Feed Compounder 1998 18(6):22-27.
 33. Santin E. Micotoxicosis: Demostraciones practicas de daño en animales. Estrategias de control. 14^a Ronda Latinoamericana de Alltech 2004
 34. Rosiles R. Petrone VM. Intoxicación por micotoxinas en aves. Diplomado en producción avícola, UNAM. 2001; 178-213.
 35. Rodricks J.V, Stoloff L. Aflatoxin residues from contaminated feed in edible tissues of food producing animals in Mycotoxins in Human and Animal Health. Pathotox publishers Inc. 1977
 36. Carabaño JM. Comportamiento productivo de los pollos de engorde ante la presencia de aflatoxina B1 en la ración. XV Congreso Latino Americano de Avicultura. Cancún Quintana Roo México. 1997;45-46.
 37. Lanza GM, Washburn W. Variation with age in response of broilers to aflatoxin. Poultry Sci. 1980:59;282-288
 38. Leeson S. Díaz G and Summers JD. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. 1995. Chapter 14: 249-298

39. Pimpukdee K, Kubena LF. Aflatoxin-induced toxicity and depletion of hepatic vitamin A in young broiler chicks: protection of chicks in the presence of low levels of NOVASil Plus in the diet. *Poultry Sci.* 2004 83:737-744
40. Pier AC. Mycotoxins and animal health. *Adv. Vet Sci. Comp. Med.* 25:185.
41. Del Río García JC, Rosillies R, Casaubon MT, Ávila GE. 25 – Hidroxicolecalciferol (25-OH-D3) y Aflatoxina B1, sobre el rendimiento productivo en pollo de engorda. VII Jornadas Médico Avícolas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. 1998; 94-98
42. Chen C, Pearsons A. Broiler aflatoxicosis with replacement of the contaminants diets. *Br. Poultry Sci.* 1981;26:65-71
43. Osborne DJ, Hamilton PB. Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. *Poultry Sci.* 1981;60:1818-1821
44. Raju M, Davegowda G. Influence of modified glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and hematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T2 toxin). *Br. Poultry Sci.* 2000 41:640-650.
45. Swamy HV, Devegowda G. Ability of mycosorb to counteract aflatoxicosis in comercial broilers *Poultry Sci.* 1998 33:273-278.
46. Afzali N, Devegowda G. Ability of modified mannan-oligosaccharide to counteract aflatoxicosis in broiler breeder hens. *Poultry Sci.* 1999 78(suppl.1):228.
47. Schaeffer JL, Tyczkowski JK, Hamilton PB. Alterations in carotenoid metabolism during Ochratoxicosis in youg broiler chickens. *Poultry Sci.* 1987;66 318-324.
48. Schaeffer JL, Tyczkowski JK, Hamilton PB. Depletion of oxycarotenoid pigments in chickens and the failure of aflatoxina to after it. *Poultry Sci* 1988; 67 1080-1086.
49. Quezada T., Cuellar T., Martínez A. Algunas alteraciones hepáticas y renales de pollo de engorda intoxicados con aflatoxina B1. VI Jornada Médico Avícola UNAM. FMVZ. Depto. Producción Animal: Aves. 12 – 14 Marzo 1997
50. Tung HT, Hamilton PB. Aflatoxicosis and bruising in chickens. *Poultry Sci.* 1971

50:795-800

51. Lee H.B, N. Magan Impact of environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. Int. J. Food Microbiol. (2000) 61 11–16
52. Hoerr FJ Micotoxicosis. In : Calnek BW Barnes JH Beard CH editors. Diseases of poultry. 10 th ed. Ames, Iowa state University press, 1997.
53. Delacruz L, Bach PH. The role of ochratoxin A metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity. J. Biopharm. Sci. (1990) 1: 277-304.
54. Marquardt RR, Frohlich AA .A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. J Anim Sci. (1992) 70: 3968-3988.
55. Kuramochi G, Gekle M, Silbernagl S (1997) Ochratoxin A disturbs pH homeostasis in the kidney: increases in pH and HCO₃⁻ in the tubules. Pfügers Archiv European J. Physiol. 434: 392-397.
56. Campbell ML, May J.D, Huff WE. Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. Poultry Sci. 1983 62:2138-2144
57. Flores-Ortiz C, Manzanares-Gómez MD. Ocurrencia natural de micotoxinas en alimentos balanceados y granos de uso pecuario en México. XXIX Convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Ixtapa Zihuatanejo 2004.
58. National. Reserch council 1994 Nutrient Requeriments of poultry Nacional Academy Press.1994
59. Peckham JC Douonik B .Acute toxicity of ochratoxins A and B in Chicks Appl. Microbiol. 1971: 21; 492-494
60. Doupnik B Peckham JC Mycotoxicity of aspergillus ochraceus to chicks Appl. Microbiol 1970: 19; 594-597
61. Huff WE Doerr JASynergism between aflatoxin and ochratoxin A in Broiler Chickens Poultry Sci 1981: 60; 550-555
62. Verma J Johri TS Swain BK Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers British Poultry Sci. 2004: 45; 512-518

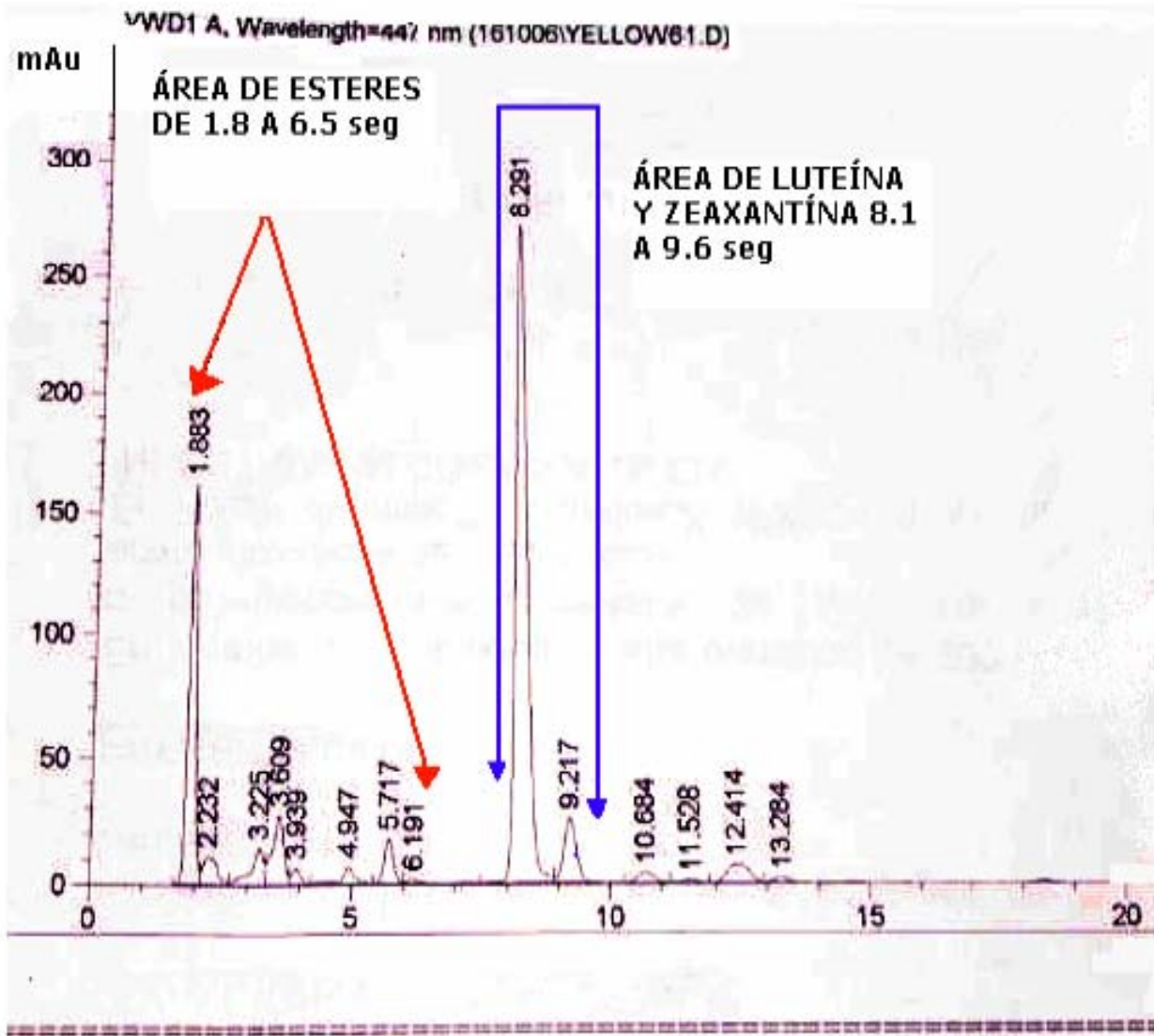
63. Kubena L.F Phillips C.R Toxicity of ochratoxin A and tannic acid to growing chicks Poultry sci. 1983 62:1786-1792
64. Osborne D.J Huff W.E Hamilton P.B Comparision of Ochratoxn, Aflatoxin and T-2 Toxin for their effects on selected parameters related to digestion and evidence for specific metabolism of carotenoides in chickens.
65. Lumeij, J.T. Chapter 20 Hepathology. In: B.W. Ritchie; G.J. Harrison; L.L. Harrison (Eds.), Avian Medicine Principles and Application. Unabridged Edition,1997 522-536.
66. Mendoza DA Pérez-Arévalo J , Gómez C, Molero G. Efecto del alimento contaminado con Aflatoxina B₁(0,07 mg/kg) sobre la morfología hepática y actividad enzimática sérica (AST Y ALT) en pollos de engorde Revista Cientifica 2006: 16; 39-47
67. Bintvihok A. Kositcharoenkul S. Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B1 J.Toxicology 2006: 47 ; 41-46
68. Aravind K.L, Patil V.S, Devegowda G. Efficacy of Esterified Glucomannan to Counteract Mycotoxicosis in Naturally Contaminated Feed on Performance and Serum Biochemicaland Hematological Parameters in Broilers Poultry Sci. 2003: 82;571–576
69. Balachandran C, Ramarkrishnan, R. Influence of dietary aflatoxin on certain serum enzyme levels in broiler chickens. Mycopathol.1998 :101(2); 65-67.
70. Del Bianchi M, Oliveira C. A. F, Albuquerque R. Effects of Prolonged Oral Administration of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 in broiler Chickens. Poultry Sci. 2005: 84;1835–1840
71. Huff WE Kubena LF Harvey RB Haggler WM. Individual and combined effects of aflatoxin and deoxynivalenol (DON, Vomitoxin) in broiler chickens Poultry Sci. 1986 65:1291-1298
72. Kubena LF Harvey RB Edrington TS Influence of ochratoxin A and diacetoxysciperol singly and in combination on broiler chickens Poultry Sci 1994 73:408-415
73. Valdivia A. G, Martinez A, Damiain FJ, Quezada T. Efficacy of N-Acetylcysteine

- to Reduce the Effects of Aflatoxin B1 Intoxication in Broiler Chickens Poultry Sci 2001 80:727–734
74. Creppy EE Schlegel R Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxin A in mice. Toxicology Lett. 1980 60:77-80
 75. Tung HT Donaldson WE Concentrations of serum proteins during aflatoxicosis Toxicology Appl Pharmacol 1975 34:320-326
 76. Quezada TA Cuellar H Jaramillo F Effects of aflatoxin B1 on the liver and kidney of broiler chickens during development Comp. Biochem and Physiol. 2000 65:265-272
 77. Gentles A, Smith E.E. Kubena LF Duffus E, Johnson P Toxicological Evaluations of Cyclopiazonic Acid and Ochratoxin A in Broilers Poultry Sci. 1999 : 78;1380–1384
 78. Sreemannarayana O Marquardt RR, Frohlich AA Organ Weights, Liver Constituents, and Serum Components in Growing Chicks Fed Ochratoxin A [Archives of Environmental Contamination and Toxicology](#). 1989: 18; 404-410
 79. Tyczkowski JK Hamilton PB Metabolism of lutein diester during aflatoxicosis in young chickens Poultry Sci 1987: 66; 2011-2016
 80. Marion JE Janky DM Ruiz N Influence of pigments in starter and finisher withdrawal diets on broilers skin and shank pigmentation Poultry Sci. 1985 64: 1310-1314
 81. Ortatatli M Oğuz H Karaman M Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure Research in Veterinary Science 2005: 78; 61-68
 82. M. Karaman; H. Basmacioglu; M. Ortatatli; Dr H. Oguz Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology Br. Poultry Sci. 2005: 46; 394-398
 83. Tessari EN, Oliveira CA, Cardoso AL, Ledoux DR, Rottinghaus GE Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks Br. Poultry Sci. 2006: 47; 357-364.
 84. Newberne PM. Chronic aflatoxicosis Journal of the American Veterinary Medical Association 1973:163; 1262-1269

85. Giambrone JJ, Diener UL, Panangala V. Effect of purified aflatoxina on broiler chickens Poultry Sci. 1985: 64; 852-858.
86. Santin E, Paulillo AC, Maiorka P, Alessi A, Krabbe E. The effects of ochratoxin /aluminosilicate interaction on the tissues and humoral immune response of broilers Avian Path. 2002: 31; 73–79
87. Huff WE. Wyatt R, Tucker TC, Hamilton PB Ochratoxicosis in the broiler chicken. Poultry Sci. 1974: 53; 1585–1591

10.1 ANEXOS

ANEXO 1. CROMATOGRAMA DE NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE ESTERES LUTEÍNA Y ZEAXANTINA EN HÍGADO.



ANEXO 2.

Correlaciones entre las variables del tratamiento con Aflatoxinas.

Deg. Grasa	Nec.Hep. 0.998 <.0001	Hip. Epi. - 0.800 0.0305	Pig Cal. 0.997 <.0001	Pig. Frío 0.998 <.0001	
Necrosis de Hepatocitos	Grasa 0.998 <.0001	Pig Cal 0.996 <.0001	Pig frío. 0.998 <.0001		
Hiper. Epitelio	Deg Gra. -0.800 0.0305				
Hiper. Conduct B.	Nec.Con. 0.890 0.003	Heterofi. -0.978 0.003			
Necrosis de Conduct B.	Hipe.Con. 0.890 0.003	Linfocito 0.779 0.022	Pig Viv -0.768 0.025		
Linfocitos	Nec.Con 0.779 0.022	Pig Viv -0.809 0.0149			
Heterófilos	HipeCon. -0.978 0.003	TGP -0.953 0.0467			
Pig Vivo	Nec Con -0.768 0.025	Linfocito -0.809 0.0149	Factor 0.972 0.005		
Pig. Caliente	Deg Gra. 0.997 <.0001	NecHep 0.996 <.0001	PigFrío 0.999 <.0001	TGO 0.925 0.002	Factor 0.999 <0.0001
Pig. Frío	Deg Gra. 0.998 <.0001	Ne Hep 0.998 <.0001	Pig Cal 0.999 <.0001	TGO 0.922 0.003	Factor 0.995 <0.0003
TGO	Pig Cal 0.925 0.002	Pig Frío 0.922 0.003	Factor 0.999 <0.001		
TGP	Heterofi. -0.953 0.0467	P.Total 0.997 0.0001			
P. Totales	TGP 0.997 0.0001				
Factor	Pig Vivo 0.972 0.005	Pig Cal 0.999 <0.0001	PigFrío 0.995 <0.003		

Valor de la correlación (P <0.05)

Deg. Grasa (Degeneración grasa), Hiper. Epitelio (Hiperplasia de Epitelio biliar), Hiper. Conduct. B. (Hiperplasia de conductos biliares), Pig. Vivo. (Pigmentación en vivo), Pig. Caliente (Pigmentación en Caliente), Pig. Frío (Pigmentación en Frío), TGO (Transaminasa Glutamica Oxalacetica) TGP (Transaminasa Glutamica pirúvica), P.Totales (Prtoteinas Totales)

Es importante hacer notar que están fuertemente relacionadas algunas lesiones en el tratamiento con aflatoxinas, como son la degeneración grasa, Necrosis de hepatocitos, Hiperplasia de epitelio biliar, hiperplasia de conductos biliares, los valores de la pigmentación en frío, caliente y en vivo. Y sobre todo el valor del factor con los niveles de pigmentación de la canal en frío y en caliente. Por lo tanto algunas de estas lesiones pueden predecir el comportamiento de otras.

Correlaciones entre las variables del tratamiento con Ocratoxinas.

Deg. Grasa	Nec Hep 0.998 <0.0001	Pig Cal 0.989 <0.001	PigFrío 0.999 <0.001	Factor 0.999 <0.001			
Necrosis de Hepatocitos	DegGras 0.998 <0.0001	Pig Cal 0.986 <0.001	PigFrío 0.999 <0.001	Factor 0.999 <0.001			
Hiper. Epitelio	Linfocitos -0.814 0.0485	Pig Frío 0.922 0.0257	TGP -0.975 0.0047				
Hiper. Conduct B.	Nec Con 0.729 0.040	Heterofil -0.817 0.046	PigVivo -0.775 0.023				
Necrosis de Conduct B.	HiperCon 0.729 0.040	Heterofil -0.989 0.002	PigVivo -0.735 0.037	TGO -0.975 0.0009			
Linfocitos	Hiper Epi -0.814 0.0485						
Heterófilos	HiperCon -0.817 0.046	NecCon -0.989 0.002	PigVivo 0.999 <0.001	PigCal 0.901 0.014	TGO 0.996 <0.0001	TGP 0.975 0.004	
Pig Vivo	HiperCon -0.775 0.023	NecCon -0.735 0.037	Heterofi 0.999 <0.001	PigFrío 0.998 <0.001	TGO 0.997 <0.0001		
Pig. Caliente	DegGras 0.989 <0.001	NecHep 0.986 <0.001	Heterof 0.901 0.014	PigFrío 0.903 <.0001	TGO 0.746 0.0263	Factor 0.999 <.0001	
Pig. Frío	DegGras 0.999 <0.001	NecHep 0.999 <0.001	HipeEpi 0.922 0.0257	PigVivo 0.998 <0.001	PigCal 0.903 <.0001	Factor 0.999 <.0001	TGO 0.903 0.0352
TGO	NecCon -0.975 0.0009	Heterofi 0.996 <0.0001	PigVivo 0.997 <0.001	PigCal 0.746 0.0263	PigFrío 0.903 0.0352	TGP 0.975 0.004	
TGP	HipeEpi -0.975 0.0047	TGO 0.975 0.004	P.Total 0.999 0.137				

P. Totales	TGP 0.999 0.137						
Factor	DegGras 0.999 <0.001	NecHep 0.999 <0.001	PIgCal 0.999 <.0001	PigFrío 0.999 <.0001			

Valor de la correlación (P <0.05)

Deg. Grasa (Degeneración grasa), Hiper. Epitelio (Hiperplasia de Epitelio biliar), Hiper. Conduct. B. (Hiperplasia de conductos biliares), Pig. Vivo. (Pigmentación en vivo), Pig. Caliente (Pigmentación en Caliente), Pig. Frío (Pigmentación en Frío), TGO (Transaminasa Glutamica Oxalacetica) TGP (Transaminasa Glutamica pirúvica), P.Totales (Prtoteinas Totales)

En el caso de la ocratoxina se observó una fuerte correlación entre la degeneración grasa, necrosis de hepatocitos, pigmentación en caliente pigmentación en frío y el factor de pigmentación.

Correlaciones entre las variables del tratamiento con Testigo.

Deg. Grasa	NecHep 0.895 0.0026						
Necrosis de Hepatocitos	DegGras 0.895 0.0026	HipEpi 0.794 0.0328					
Hiper. Epitelio	NecHep 0.794 0.0328	P.Total 0.984 0.0152	Factor 0.816 0.0250				
Hiper. Conduct B.							
Necrosis de Conduct B.							
Linfocitos							
Heterófilos							
Pig Vivo	TGP 0.999 <0.0001						
Pig. Caliente	Pig.Frío 0.999 <0.0001	TGO 0.999 <0.0001					
Pig. Frío	Pig Cal 0.999 <0.0001	TGO 0.960 <0.0023	TGP 0.999 <0.001				
TGO	PigCal 0.999 <0.0001	PigFrío 0.960 <0.002	TGP 0.999 <0.0001				
TGP	PigVivo 0.999 <0.0001	PigFrío 0.999 <0.001	TGO 0.999 <0.0001				
P. Totales	HipeEpi 0.984 0.0152						
Factor	HipeEpi 0.816 0.0250						

Valor de la correlación (P <0.05)

Deg. Grasa (Degeneración grasa), Hiper. Epitelio (Hiperplasia de Epitelio biliar), Hiper. Conduct. B. (Hiperplasia de conductos biliares), Pig. Vivo. (Pigmentación en vivo), Pig. Caliente (Pigmentación en Caliente), Pig. Frío (Pigmentación en Frío), TGO (Transaminasa Glutamica Oxalacetica) TGP (Transaminasa Glutamica pirúvica), P.Totales (Prteinas Totales)

En el tratamiento testigo existió una correlación fuerte entre la pigmentación en vivo y caliente, con los niveles de enzimas hepáticas (TGO y TGP) y la degeneración grasa con la necrosis de hepatocitos.

Correlaciones entre las variables del tratamiento con AFLATOXINA+OCRATOXINA.

Deg. Grasa	PigFrío -0.721 0.028	TGP -0.690 0.0271	P.Total -0.820 0.0068			
Necrosis de Hepatocitos	Hip.Epi -0.617 0.057	PigVivo -0.686 0.0412				
Hiper. Epitelio	Nec.Hep -0.617 0.057	Linfocito 0.649 0.042	Heterofil 0.687 0.028	PigVivo 0.927 0.0003	Factor 0.839 0.009	
Hiper. Conduct B.	Nec.Con 0.995 <0.0001	Linfocito 0.769 0.0093	TGO 0.997 <0.0001	TGP 0.934 <0.0001		
Necrosis de Conduct B.	Hipe.Con 0.995 <0.0001	Linfocito 0.800 0.0054	TGO 0.997 <0.0001	TGP 0.918 <0.0002		
Linfocitos	HiperEpi 0.649 0.042	HiperCon 0.769 0.0093	NecCond 0.800 0.0054	PigVivo 0.716 0.0298	TGO 0.813 0.007	TGP 0.789 0.006
Heterófilos	HiperEpi 0.687 0.028	PigVivo 0.851 0.003	PigFrío -0.703 0.0343			
Pig Vivo	Nec.Hep -0.686 0.0412	HiperEpi 0.927 0.0003	Linfocitos 0.716 0.0298	Heterofil 0.851 0.003	Factor 0.934 0.002	
Pig. Caliente	PigFrío 0.708 0.0326	P.Total 0.688 0.040				
Pig. Frío	DegGras -0.721 0.028	Heterofil -0.703 0.0343	PigCalien 0.708 0.0326			
TGO	HiperCon 0.997 <0.0001	Necr.Con 0.997 <0.0001	Linfocito 0.813 0.007	TGP 0.957 <0.0001	P.Total 0.999 <0.0001	
TGP	DegGras -0.690 0.0271	HiperCon 0.934 <0.0001	NecrCon 0.918 <0.0002	TGO 0.957 <0.0001	P.Total 0.999 <0.0001	
P. Totales	DegGras -0.820 0.0068	PigCal 0.688 0.040	TGO 0.999 <0.0001	TGP 0.999 <0.0001	Factor 0.812 0.0265	
Factor	HiperEpi 0.839 0.009	PigVivo 0.934 0.002	P.Total 0.812 0.0265			

Valor de la correlación (P <0.05)

Deg. Grasa (Degeneración grasa), Hiper. Epitelio (Hiperplasia de Epitelio biliar), Hiper. Conduct. B. (Hiperplasia de conductos biliares), Pig. Vivo. (Pigmentación en vivo), Pig. Caliente (Pigmentación en Caliente), Pig. Frío (Pigmentación en Frío), TGO (Transaminasa Glutamica Oxalacetica) TGP (Transaminasa Glutamica pirúvica), P.Totales (Prtoteinas Totales)

En el tratamiento con la combinación de micotoxinas en la mayoría de las lesiones existió una correlación pero principalmente fueron necrosis de hepatocitos, hiperplasia de epitelio, hiperplasia de conductos biliares, niveles de enzimas hepáticas (TGO y TGP), con la pigmentación en vivo y el factor de pigmentación.