



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**EFFECTOS DE LA PARED CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* SOBRE
POLLOS DE ENGORDA SUPLEMENTADOS CON ALIMENTO
CONTAMINADO CON AFLATOXINA B₁ Y B₂**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:
ANGEL YAIR VERGARA VARGAS**

**TUTOR:
M.C. JUAN OMAR HERNÁNDEZ RAMIREZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos La Tesis:

Efectos de la pared celular de Saccharomyces cerevisiae sobre pollos de engorda suplementados con alimento contaminado con aflatoxina B1 y B2.

Que presenta el pasante: ANGEL YAIR VERGARA VARGAS

Con número de cuenta: 40806312-2 para obtener el Título de: Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de septiembre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Juan Carlos del Rio Garcia	
VOCAL	M. en D.H. Graciela Castañeda Aceves	
SECRETARIO	M. en C. Juan Omar Hernández Ramirez	
1er SUPLENTE	M. en C. Celso López López	
2do SUPLENTE	Dra. Cynthia González Ruiz	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

(Art 127 REP)

HHA/Vc

DEDICATORIA.

A mi madre.

“Detrás de cada gran hombre, hay una gran mujer”...no estoy seguro si yo sea un gran hombre, creo que aun falta mucho para demostrarlo, de lo que si estoy seguro, es que tu si eres una gran mujer, una mujer luchona y guerrera que nunca se ha dejado vencer por las adversidades, eres la persona que mas admiro, porque a pesar de lo largo y difícil que ha sido el camino, siempre has estado ahí para mi y para mis hermanos; porque a pesar de las dificultades nos sacaste a todos adelante; porque con todos los regaños y tirones de oreja, hiciste de nosotros unas mejores personas. Me siento orgulloso de que seas mi madre, te amo Lucy.

A mi padre.

Porque a pesar de la distancia en todos estos años, siempre te he tenido en mi corazón y en mis pensamientos, gracias por el apoyo que me brindaste para hacer que este sueño fuera posible. Me hubiera gustado pasar mas momentos juntos, compartir mas recuerdos y vivir mas experiencias...tal vez en los próximos años o quizá en la siguiente vida...te amo viejo.

A mis hermanos.

Gaby: Porque fuiste como una segunda mamá que siempre me brindo toda la ayuda necesaria, porque eres el vivo ejemplo de lo que nos ha dejado nuestra madre, porque al igual que ella eres una gran mujer que nunca se doblega. **Sandra:** Porque fuiste mi primer amiga dada la cercanía de la edad, siempre atesorare los recuerdos juntos, ojala que con el paso de los años no se pierda esa amistad. **Adrián y Andrés:** Porque realmente no somos tan diferentes, compartimos muchos gustos que tal vez a ojos ajenos pudieran parecer raros pero creo que es un lazo que nos puede unir mas, a final de cuentas somos hermanos, en algo nos teníamos que parecer. Los amo a todos y cada uno de ustedes.

A Nayeli.

Porque estuviste conmigo desde el principio hasta el final de este proyecto, pudiste ver todo lo que pase durante este tiempo, desde mis enojos, desesperación e inclusive mi frustración cuando algo salía mal, pero también mi alegría cuando todo salía a la perfección. Te agradezco tu apoyo, paciencia y amor para poder culminar esta meta. Se que compartir mi vida puede llegar a ser un poquito difícil, sobretodo por mis gustos “raros” según tu, por eso te agradezco tu apoyo incondicional, pero aun queda camino que recorrer, así que sigamos caminando juntos. Te amo!

A mi asesor y amigo, M.C Omar Hernández. Gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo y por la confianza que me brindaste para poder realizar este trabajo, gracias por la infinita paciencia y también por los regaños que fueron necesarios para que este trabajo rindiera frutos.

A los partícipes directos de esta tesis, desde los jefes **Omar y Ernesto**, hasta mis compañeros tesisistas **Marcela y Gerardo**, juntos hacemos el mejor equipo!! Estoy muy agradecido porque además del conocimiento aprendido, esta tesis me dejo cuatro excelentes amigos.

Lilith Naiad. “*Almost hope you’re in heaven, so no one can hurt your soul*”.

AGRADECIMIENTOS.

AMarcela. Creo que sin duda hacemos un gran equipo de trabajo, tanto con los pollos como en el laboratorio, fue un gran gusto trabajar juntos, haber que más proyectos nos llegan en el futuro, agradezco haberte conocido y que nos uniera este trabajo, me alegra poder ser tu amigo carnalita

AKaty. Por ser mi amiga y una gran compañera de trabajo, gracias por recibirme bien en la caseta y por enseñarme mucho de lo que aprendí ahí, agradezco todos los momentos dentro y fuera de las casetas.

A mis amigos. Por todos los momentos compartidos en la facultad y también fuera de ella, agradezco su amistadya que son una parte especial de mi vida.

A Mariana. Agradezco por habernos conocido, sin duda, pasamos por mucho, cosas buenas y cosas malas, pero por algo pasaron, creo que para hacernos mas fuertes y darnos cuenta de muchas cosas; guardo con cariño todas las vivencias y memorias.

A los médicos Francisco Cervantes y Celso López. Por haberme aceptado en la caseta y por compartir todas sus experiencias, gracias a lo que me enseñaron ahí adquirí este afecto por las aves, con ustedes aprendí lo que es el verdadero trabajo rudo y a no darme por vencido por difíciles que sean las cosas. Gracias por brindarme su amistad.

Al M.V.Z. Carlos Ávila. Por enseñarme muchas cosas a lo largo de mi paso por la caseta y por darme la confianza para trabajar con usted en el modulo de aves, llegar ahí fue un momento crucial en mi carrera y lo agradezco infinitamente.

A la Dra. Yola de Histopatología. Por habernos ayudado tanto con nuestros cortes y por su gran paciencia cuando la regábamos.

Al laboratorio 14 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán, por sus apoyo para la realización de esta tesis.

A Josefina Moreno Lara y Cristina Reyes de la Unidad de Granos y Semillas - UNIGRAS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Por haberme dado la oportunidad de ser parte de esta gran institución, me siento orgulloso al decir que soy de la UNAM.

Al modulo de aves del CEA y a todos los que conocí ahí, mi paso por el modulo forjo parte de lo que soy ahora.

A la sección de Patología de la FES Cuautitlán y a aquellos que me ayudaron para realizar este trabajo.

Para Frida, Rocky, Negro, Terry, Clemon, Pandora, Mephisto, Persephone, Apolo, Norberto y Gordis.

Mis recuerdos me acompañaran en el camino.

ÍNDICE.

	Pág.
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Situación actual de la producción de carne de pollo en México	2
1.1.1. Insumos alimenticios	4
1.2. Micología	5
1.2.1. Generalidades de los hongos	6
1.3. Antecedentes sobre las micotoxinas	8
1.3.1. Generalidades sobre las micotoxinas	10
1.4. Características para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas	11
1.4.1 Factores físicos	11
1.4.2. Factores químicos	12
1.4.3. Factores biológicos	13
1.5. Contaminación con micotoxinas de alimentos para animales	13
1.6. El <i>Aspergillus</i>	14
1.6.1. Clasificación Taxonómica	15
1.6.2 Características morfológicas	16
1.6.3. Características para su desarrollo	16
1.6.4. Cultivo <i>in vitro</i>	17
1.7. Aspergilosis	17
1.8. Micotoxinas producidas por <i>Aspergillus</i>	18
1.9. Las aflatoxinas	18
1.9.1. Metabolismo de las aflatoxinas	20
1.9.2. Toxicidad	23
1.9.3. Aflatoxicosis en aves	23
1.9.3.1. Signos clínicos	25
1.9.3.2. Alteraciones morfológicas	25
1.9.3.3. Alteraciones en pruebas de laboratorio	26
1.9.3.4. Respuesta Inmune	27
1.9.4. Detección de micotoxinas en los alimentos	27
1.9.5. Control y prevención	30
1.10. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
1.10.1 Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
1.10.2 Fracciones de levaduras	33
1.10.3. Fabricación industrial de PCL y extractos de levaduras	34
1.10.4. Características de la PCL	34
1.10.5. Composición de la PCL	35
1.10.6. Estructura de la PCL	35
1.10.7. Utilización de levaduras en la alimentación animal	37
1.10.7.1. Utilización de PCL, manano-oligosacáridos y β -glucanos en la alimentación animal	38
1.10.8. Mecanismos de acción de las levaduras y PCL adicionadas en el alimento	40
1.10.8.1. Exclusión de patógenos y micotoxinas	41
1.10.8.2. Exclusión de bacterias fimbria-1 específicas	42
1.10.8.3. Secuestro de micotoxinas	43

1.10.8.4. Efecto trófico sobre la mucosa digestiva	44
1.10.8.5 Estimulación del sistema inmune	46
2. JUSTIFICACIÓN	50
3. HIPOTESIS	50
4. OBJETIVOS	51
4.1. Objetivo general	51
4.2. Objetivos particulares	51
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	52
6. MATERIALES Y METODOS	53
6.1. Obtención de aflatoxinas	53
6.2. Paredes celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
6.3. Caseta avícola	54
6.4. Parámetros productivos	56
6.5. Vacunación	56
6.6. Toma de sangre y obtención de suero	57
6.6.0.1. Material	57
6.6.0.2. Método	58
6.6.1. Determinación de proteínas totales y albúmina	58
6.6.2. Determinación de títulos de anticuerpos	60
6.6.2.1. Material para la técnica de inhibición de la hemoaglutinación	60
6.6.2.2. Método para la técnica de inhibición de la hemoaglutinación	60
6.6.2.3. Interpretación para la técnica de inhibición de la hemoaglutinación	61
6.6.3. Perfil bioquímico	61
6.6.3.1. Material para el perfil bioquímico	61
6.6.3.2. Determinación de enzimas séricas	62
6.6.3.2.1. AlaninaAminotransferasa (ALT)	62
6.6.3.2.2. AspartatoAminotransferasa (AST)	62
6.6.3.2.3. Fosfatasa Alcalina (FAS)	63
6.7. Necropsias y obtención de órganos	65
6.7.1. Material para necropsias y obtención de órganos	65
6.7.2. Método para necropsias y obtención de órganos	65
7. ANÁLISIS ESTADISTICO	66
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
9. CONCLUSIONES	88
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

RESUMEN.

Se evaluó el impacto de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL) sobre los parámetros productivos (ganancia de peso, consumo de alimento, índice de conversión alimenticia), peso relativo de órganos (hígado, riñón, bazo y bolsa cloacal), inmunidad humoral (respuesta a la vacunación contra Newcastle), bioquímica sanguínea (proteínas totales, albumina) y cinética enzimática (ALT, AST, FAS) en pollos de engorda Ross 308 alimentados con aflatoxina B₁ y B₂ (AFB). Se formaron 4 tratamientos experimentales con 3 repeticiones cada uno y cada repetición con 10 animales, con una distribución completamente al azar, se utilizaron pollos de un día de edad, línea Ross 308 sin sexar. Los tratamientos fueron: 1. PCL (0.5 Kg/Ton), 2. AFB 200 (200 µg/Kg), 3. Mezcla (PCL 0.5 Kg/Ton + AFB 200 µg/Ton), 4. Control. Se realizó manejo zootécnico para medir parámetros productivos como pesaje de los animales y del alimento; para realizar la bioquímica sanguínea se realizó la toma de muestra de sangre por punción cardiaca, las muestras obtenidas se utilizaron para determinar la concentración de proteínas totales, albumina y enzimas séricas. La titulación de anticuerpos vacunales se realizó mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Se realizaron necropsias para observar órganos y obtener el peso relativo de estos. Los resultados obtenidos muestran que el contenido de PCL a 0.5 Kg/Ton actuó de manera efectiva hacia las aflatoxinas en un contenido de 200 µg/Kg en lo que se refiere a peso final, consumo de alimento e índice de conversión alimenticia mostrando diferencia estadística ($p < 0.05$); las pruebas para medir la concentración de proteínas sanguíneas mostraron una mejor respuesta en el tratamiento Mezcla en comparación con el tratamiento AFB 200 demostrando la eficacia de la PCL sobre las AFB presentando diferencia estadística ($p < 0.05$); la prueba inmunológica de HI demostró que la utilización de PCL mejoró la respuesta vacunal contra Newcastle presentando diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los tratamientos PCL y AFB 200; en las pruebas para enzimas séricas y el peso relativo de órganos (hígado, riñón, bazo, bolsa cloacal) se demuestra que el uso de las PCL ayudan a disminuir los efectos de las AFB con diferencia estadística ($p < 0.05$) entre tratamientos. Con base en estos resultados se puede concluir que la utilización de las PCL en un contenido de 0.5 Kg/Ton en la dieta del pollo de engorda contaminada con AFB a 200 µg/Kg, disminuyó claramente los efectos tóxicos de las AFB para los parámetros productivos, concentración de proteínas totales, cinética enzimática, titulación de anticuerpos contra Newcastle y pesos relativos de hígado, riñón, bazo y bolsa cloacal.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Situación actual de la producción de carne de pollo en México.

Las actividades pecuarias repercuten en el desarrollo socioeconómico del país y en las diferentes partes del sector primario, ya que en conjunto han funcionado como pilar en el desarrollo de la industria del país, al proveer de materias primas, alimentos, empleos y además distribuyen los ingresos del sector rural. La producción de carne es la actividad productiva más distribuida del sector rural, ya que se realiza prácticamente en todas las regiones geográficas del país.

Aproximadamente la superficie total aprovechada por la ganadería en el país es superior a las 110 millones de hectáreas, representando un 60% de la superficie del país, dentro de los cuales 107.8 millones de hectáreas corresponden a pastizales y el resto corresponde a superficies agrícolas, cuyo producto se destina a la alimentación de los animales de producción. La producción de carne, se da en una diversa gama de sistemas productivos, que pueden ir desde los más tecnificados hasta las economías dirigidas al consumo familiar.¹

En México, el desarrollo ha ocasionado un rápido crecimiento demográfico, así como una gran concentración de la población en las grandes ciudades, teniendo como resultado un gran impacto en los hábitos alimenticios de la población y en la demanda de alimentos para la misma, requiriéndose así, sistemas de producción que puedan crear cantidades suficientes de alimentos de origen animal para satisfacer las necesidades de las grandes y pequeñas ciudades. La ganadería en lo referente al consumo de carne se encuentra catalogada como una de las actividades productivas con mayor auge en las últimas décadas y con proyecciones de interés para 2020.²

La producción de carne en México se sustenta en diferentes ramas de la ganadería, dentro de las cuales, sobresalen la avícola, la porcina y la bovina, que en conjunto aportan el 98% de la producción doméstica de productos cárnicos, el resto de las actividades destinadas a la producción de carne, como son la producción ovina, caprina, entre otros, mantienen una posición restringida e influenciada por los hábitos de consumo de la población, así también por regiones establecidas de consumo de algunas

de ellas en el territorio nacional y aunada a los precios fluctuantes de éstas. Este crecimiento en la producción ganadera, ayudo a crecer ampliamente a la avicultura, para el año 2013, la producción de carne de pollo represento el 24% del valor de la producción pecuaria del país, aportando así el 47% de la producción nacional de carnes, lo que fue representado con 2,854.5 toneladas de carne, aumentando un 5.6% la producción con respecto al año 2010 (Tabla 1).³

Tabla 1. Producción y consumo de carne de ave en México del año 2012 al 2014.³

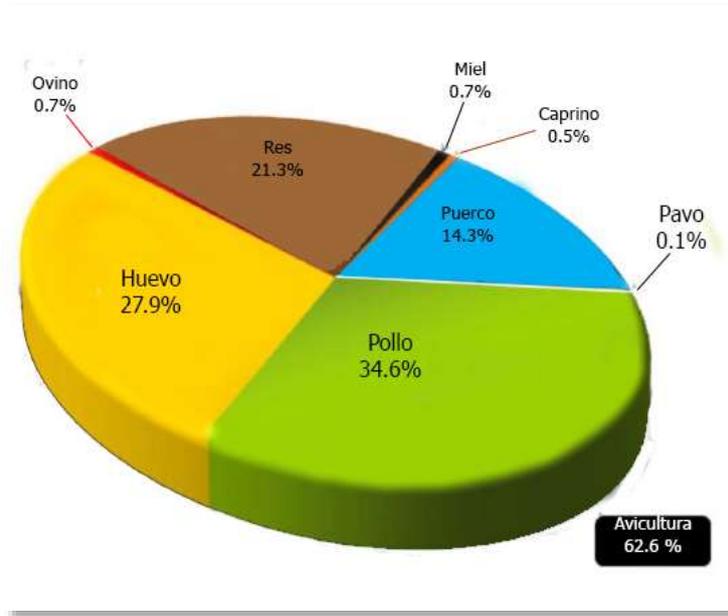
	Año		
	2012	2013	2014
Producción (Ton)	2,821	2,839	2,852
Importaciones (Ton)	371	373	376
Consumo per cápita (Kg)	27.5	27.7	28

Derivado de los cambios en la dieta de los consumidores y de los precios relativamente bajos del pollo en comparación con los de la carne de cerdo o la de bovino, se espera que el consumo per cápita de pollo se incremente de 27.5 kg en 2012 a aproximadamente 30 kg en el año 2020.³

La producción avícola es una actividad pecuaria que en tiempos recientes ha alcanzado un desarrollo significativo, tanto en sus aspectos clínicos y zootécnicos, como en genética y nutrición. En particular en México, representa una de las actividades de producción de alimentos de origen animal más importantes, ya que se ha reconocido que nuestro país ocupa uno de los primeros lugares en el mundo en el consumo de huevo y carne de pollo.⁴

El incremento en la producción avícola conduce a un crecimiento en el consumo de alimentos balanceados y por lo tanto de granos y cereales que conforman dichos alimentos balanceados.

Figura 1. Producción pecuaria de México.



1.1.1. Insumos alimenticios.

La alimentación corresponde entre el 65% y 70% de los gastos de una explotación, por lo que es de suma importancia para la producción animal. Siendo así uno de los principales retos actuales, en el ámbito mundial, la producción de alimentos libres de contaminantes. En los países en vías de desarrollo, alrededor del 85% de la alimentación depende de los productos agrícolas, mientras que en los países desarrollados solo es el 40%, en términos generales se considera que la dieta del hombre está constituida por un 70% de productos de origen animal.³

Los altos estándares de productividad que se requieren en la avicultura se basan en una gran cantidad de elementos que participan en cada una de las etapas del proceso. La disponibilidad de granos y materias primas con cualidades nutricionales y de inocuidad, son el requisito primario en la producción de proteína animal.

Existen una variedad de factores que pueden modificar la calidad ya sea nutritiva u organoléptica de esta materia prima, lo que se puede traducir en pérdidas en la producción, los principales factores que pueden afectar a los alimentos son los siguientes:⁵

- Daños por condiciones climáticas (humedad, temperatura)
- Daños mecánicos
- Contaminación por agentes químicos
- Contaminación por microorganismos patógenos
- Contaminación por insectos
- Contaminación por hongos

La gran mayoría de los productos agrícolas son invadidos por diverso microorganismos durante su desarrollo en el campo, siendo los hongos los más abundantes y la principal causa de enfermedades, lo que ocasiona fuertes pérdidas económicas; en particular, los granos y las semillas son invadidos por diversos hongos en almacén, la bodega o el silo.

1.2. Micología.

Es la rama de la medicina encargada del estudio de los hongos; los hongos son vegetales carentes de clorofila pertenecientes al grupo de las talofitas, esta carencia de clorofila es una característica que los distingue de otros vegetales y además, este hecho implica que ellos no sean capaces de sintetizar materia orgánica utilizando luz solar como fuente de energía, por este motivo deben desarrollarse sobre un sustrato que contenga materia orgánica, son cosmopolitas y pueden encontrarse en cualquier tipo de alimento, así como en almacenes, silos, graneros y muchos otros lugares. Clasificaciones más modernas incluyen a los hongos en el reino protista, sin embargo y visto que los hongos se alimentan por absorción, se considera que los hongos no son plantas ni animales, pero si un dominio diferente llamado reino Fungi. Se han descrito varios géneros que son beneficiosos para el hombre, pues se pueden utilizar en la producción de ácido cítrico, fabricación de quesos, así como en el área de la salud para la producción de diferentes antibióticos.⁵

Tanto unicelulares como pluricelulares, los hongos son organismos eucariontes, de los cuales se han descrito aproximadamente 100,000 especies, aunque se calcula que su número real puede acercarse a los 250,000. Podemos dividir a los hongos en dos tipos como se aprecia en la tabla 2.^{6,7}

Tabla 2. Tipo ecológico de los hongos.⁸

Tipo de hongo	Humedad Relativa	Temperatura de producción	Potencial Oxido-reducción	Sustrato	Especie fúngica
Almacén	< 95%	20-25 °C	Anaerobios facultativos	Material fisiológicamente inactivo	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>
Campo	> 95%	< 20 °C	Aerobios	Material vivo	<i>Fusarium</i> <i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i>

- Hongos de campo. Son las especies que contaminan los granos antes de la cosecha, durante su desarrollo en la planta. Estos hongos, para desarrollarse necesitan un alto contenido de humedad. Sus esporas pueden sobrevivir durante mucho tiempo en los granos húmedos, pero no germinan cuando la humedad relativa es menor al 75%.
- Hongos de almacenamiento. Se desarrollan después de la cosecha, los hongos que proliferan con mayor frecuencia son especies como: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. Los daños causados por los hongos de almacenamiento son mayores que los producidos por los hongos de campo, además de que pueden contaminar a las semillas con metabolitos secundarios.

1.2.1. Generalidades de los hongos.

El núcleo de los hongos, contiene un nucleolo y varios cromosomas limitados por una membrana nuclear. Al igual que en otros organismos eucariontes, los hongos tienen mitocondrias, ribosomas y centríolos. La pared celular de los hongos esta constituida principalmente por quitina, citosamina y glucanina, esta pared celular semeja un extenso sistema tubular, por donde avanza protegido el citoplasma para su dispersión y búsqueda de nutrientes.^{5,6}

Los elementos somáticos tubulares que constituyen el micelio reciben el nombre de hifas, estas pueden ser uninucleadas o multinucleadas y pueden estar separadas por medio de septos o también pueden carecer de ellos.⁹

Los hongos y la variedad en sus especies, en base a su evolución y sus características se han logrado adaptar a los animales, vegetales y al hombre, dentro de los principales hongos que afectan a estos, están los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*.⁸

Los hongos se pueden dividir en dos grandes grupos: las levaduras y los mohos, las esporas de los mohos, germinan para producir filamentos de ramificación conocidos como hifas. Las levaduras por otro lado, son formas solitarias redondas que se reproducen a través de mecanismos tales como el florecimiento o la fisión formando colonias típicamente húmedas y mucoides.⁷

Los géneros de mohos y levaduras más importantes

- Levaduras: *Candida*, *Rhodotorula*, *Mycoderma*.
- Mohos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Absidia*, *Rhizopus*.

Los mohos producen diversas clase de conidias, estas, se desarrollan en los esporóforos, que son estructuras especializadas que se diseminan en el aire a partir del micelio vegetativo y las conidias se acumulan en el extremo superior de los mismos. Muchos mohos pueden reproducirse a través de esporas sexuales, generadas por meiosis de un núcleo diploide.⁹

Los mohos con estructuras reproductoras sexuales se engloban en 3 grupos:

- Basidiomicetos
- Ascomicetos
- Zigomicetos.

Los basidiomicetos desarrollan las esporas sexuales externamente, los ascomicetos producen sus esporas en ascas que se forman dentro de un cuerpo fructífero.⁹

Los hongos tienen gran capacidad para infectar tejidos vegetales vivos, con un gran poder de invasión, diseminación y deterioro de productos almacenados, a esto, se

deben añadir problemas de micosis y la capacidad genética que algunos de ellos tienen para producir metabolitos secundarios tóxicos denominados como micotoxinas, con la consecuente posibilidad de producir Micotoxicosis en los animales y humanos que consumen alimentos contaminados.^{5,6}

1.3. Antecedentes sobre las micotoxinas.

Ciertos hongos filamentosos son capaces de producir metabolitos secundarios (no esenciales para su crecimiento), muchos de los cuales han sido asociados con la aparición de efectos adversos en humanos y en animales. Estos compuestos se conocen con el nombre de micotoxinas y se producen en los alimentos bajo determinadas condiciones ambientales físicas, químicas y biológicas.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por algunas especies de hongos, son compuestos policetónicos que resultan cuando se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los hongos.⁵

Existen datos de que las micotoxinas han estado acompañando al hombre durante toda su existencia, ya que se habla sobre enfermedades asociadas al consumo de alimento contaminado con hongos, tal es el caso del ergotismo, que es una enfermedad asociada al consumo de alimentos contaminados con cornezuelo de centeno, que los persas llamaron “pústula nociva de la espiga del centeno” y provocaba que mujeres embarazadas abortaran y murieran al dar a luz. Se sugiere que la última plaga, la muerte de los primogénitos, mencionada en la biblia, pudo deberse al consumo de cereales contaminados por tricótesenos y que por razones culturales, lo consumían en primer lugar los hombres e hijos varones, lo que dio lugar a hemorragias y muerte.^{5,10,11}

En el 430 a. C., una epidemia entre los espartanos fue posiblemente debida al consumo de alcaloides derivados del género *Claviceps*.¹²

En la edad media aparecieron por primera vez descripciones de envenenamiento por cornezuelo, se registraron epidemias cuya característica era gangrena de pies, piernas, manos y brazos, se decía que los enfermos eran consumidos por el fuego

sagrado, por lo que a la enfermedad se le denominó como “Fuego de San Antonio” en honor al santo en cuyo santuario se buscaba la sanación, es probable que el alivio encontrado al viajar al santuario fuera real, ya que los peregrinos no consumían centeno contaminado durante el viaje. En 1875 se identificaron los componentes tóxicos del hongo *Claviceps purpurea* como responsable del ergotismo.¹²

En 1934 en Illinois, USA, murieron 5000 caballos al consumir maíz contaminado con mohos, para 1939 se aislaron dos toxinas del *Aspergillus fumigatus*, una pirógena y una hemolítica.¹²

En 1940, el distrito de Orenburg de la antigua Unión Soviética, se vio afectado por una epidemia de aleukia toxica alimenticia, que es una enfermedad que produce leucopenia, disminuyendo así la inmunidad y la resistencia a enfermedades, todo esto debido al consumo de mijo contaminado con tricótesenos, produciendo así numerosas muertes, llegando en algunas comarcas hasta el 10% de la población.^{11,12}

En 1960, la aparición de una enfermedad en pavos del Reino Unido, ocasiono la muerte de 100,000 pavipollos, denominándose la “Enfermedad X de los pavos” (Turkey X Disease).El origen de la enfermedad se encontró en la harina de cacahuate proveniente de Brasil, que se mezcló con el alimento. En poco tiempo hubo brotes similares que afectaron a diversas aves de corral, con una pronta investigación se detectó al hongo responsable, *Aspergillus flavus*, además también se logró aislar sus metabolitos tóxicos, las **aflatoxinas**.^{12,13,14}

A partir de este incidente y del aislamiento de las aflatoxinas que produce *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, se hizo clara la importancia de los hongos en la contaminación de los alimentos, tanto de consumo humano como para consumo animal y a partir de ese momento la medicina humana y veterinaria les dio mas importancia a las micotoxinas debido a que aun a bajas concentraciones, estas pueden repercutir en el estado de salud humana y animal provocando con ello perdidas económicas importantes.^{12,13}

1.3.1. Generalidades sobre las micotoxinas.

La palabra “micotoxina” proviene de la raíz griega *Miko*=Hongo y *Toxina*=Veneno, siendo así considerado como *veneno de hongos*. Las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos durante la biosíntesis de los ácidos grasos, realizada por los mohos, estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los mohos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento de los hongos toxigénicos, ya que no son necesarias para el crecimiento de los mismos pero contribuyen al mantenimiento del organismo en su ambiente natural. Los hongos toxigénicos pueden producir uno o más de estos metabolitos secundarios.^{12,13}

La presencia de micotoxinas en los productos alimenticios depende de cepas específicas de hongos que deben estar sujetas a la influencia de factores ambientales como la temperatura o la humedad, por esta razón la contaminación con micotoxinas hacia los alimentos puede variar según las condiciones climáticas, geográficas y tipos de almacenamiento.¹⁵

Las micotoxinas producen la enfermedad conocida como micotoxicosis cuando son consumidas por los animales o el hombre, esta ingestión ocurre principalmente por el consumo de alimentos contaminados con estos metabolitos, pudiendo provocar deterioro de la función hepática y renal, otras micotoxinas pueden tener efectos neurotóxicos, otras, además pueden interferir en la síntesis de proteínas, mientras que otras son agentes teratogénicos y mutagénicos.¹¹

Los factores que pueden influir en el impacto de la micotoxicosis son:^{5, 11}

- Especie
- Raza
- Mecanismos de acción
- Inmunidad
- Metabolismo

Las Micotoxicosis se caracterizan por estar de forma dependiente de los alimentos, por no ser infecciosa, contagiosa, transferible y no se relaciona con otros microorganismos aparte de los hongos.¹²

1.4. Características para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas.

1.4.1. Factores físicos.

a) Humedad y agua disponible. La cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos es uno de los factores importantes para el desarrollo de los hongos y para la producción de micotoxinas, pero no solo influye la cantidad de agua sino también la presentación de la misma, así pues, el agua se encuentra en forma libre y en forma combinada.^{6,12}

- El agua libre existe dentro y alrededor de los tejidos vegetales o de las células y puede ser eliminada sin interferir seriamente con los procesos vitales. Para la germinación de las esporas de los hongos es necesario que el agua se presente de esta forma.
- La forma combinada esta en los tejidos vegetales y animales, formando parte de las células que los componen y en unión con las proteínas y los glúcidos.

b) Actividad del agua (AW). Es la relación que existe entre la humedad en los alimentos y la capacidad de los microorganismos para proliferar con ella. El AW nos indica cual es la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos una vez se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema alimento-medio ambiente. Con un AW a 25 °C del 0.85, las esporas fúngicas germinaran en 5-12 días.⁵

c) Temperatura. La temperatura óptima para que se desarrollen los hongos se encuentra entre 25°C y 30 °C, con un límite máximo entre 40°C y 45°C. Cabe destacar que la mayor parte de los hongos no crecen por debajo de 5°C y que sin embargo hay hongos como el *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* que

pueden crecer muy bien hasta los 55°C y otros como el *Penicillium expansum* y el *Penicillium cyclopium* que son capaces de crecer a 0 °C.^{6,12}

- d) Integridad física de los granos. Los tegumentos intactos del grano dificultan el acceso del hongo al almidón endospermico. Los granos partidos por lo tanto son más susceptibles de invasión y desarrollo fúngico, que los granos enteros. Esencialmente esto es debido a un aumento de la superficie de cultivo y una mayor predisposición para que el hongo contacte con la parte interna del grano, la cual es más vulnerable que la cutícula o parte externa.^{6,12}

1.4.2. Factores químicos.

- a) pH. Los hongos toleran un gran intervalo de pH, que va desde el 2.5 hasta 7.5, de un modo general soportan mejor el medio ácido que el alcalino. Es de destacar que ellos mismos son capaces de alterar el pH, utilizando como fuente de energía los ácidos orgánicos del alimento o los excretados por bacterias acidificantes que pueden aparecer durante el periodo de deterioro del alimento.^{6,12}
- b) Composición del sustrato. Los hongos se nutren de micro y macro elementos existentes en el sustrato donde se desarrollan. Sin embargo la composición del sustrato está muy ligada a la producción de la micotoxina. Los nutrientes minerales están relacionados con la composición del sustrato y a pesar de que el hierro y el zinc son los elementos más importantes para un desarrollo fúngico, tanto éstos como otros pueden ser necesarios para la producción de micotoxinas. Un ejemplo es el caso de la aflatoxina, en la cual son necesarios sustratos ricos en zinc y ciertos aminoácidos para que el hongo produzca la aflatoxina.^{5, 6,12}
- c) Potencial óxido-reducción. La mayor parte de los hongos son aerobios, por lo que necesitan oxígeno para el desarrollo de sus reacciones metabólicas. Una carencia de oxígeno condiciona el crecimiento de los hongos y la ausencia total puede llegar a producir la muerte de éstos. El anhídrido carbónico puede inhibir la formación de algunas micotoxinas, como las aflatoxinas. Una atmósfera con 20% a 40% de CO₂ en combinación con una temperatura reducida (17°C) o bien

una humedad relativa reducida o ambos factores, previenen la formación de aflatoxina.^{6,12}

1.4.3. Factores biológicos.

- a) Zonas de Microflora. En lugares de almacenaje de los granos pueden existir pequeñas zonas del alimento con alto contenido de humedad susceptibles de desencadenar un desarrollo fúngico, lo cual después puede provocar un aumento general de humedad en el sustrato y consecuentemente una mayor contaminación fúngica y predisposición para la producción de micotoxinas.^{6,12}
- b) Presencia de invertebrados. La presencia de insectos actúa como agente de diseminación de la microflora y por lo tanto contribuye al crecimiento y multiplicación de los hongos. El propio metabolismo del insecto eleva el contenido de humedad del sustrato y además la rotura del pericarpio permite la infección del interior del grano.^{6,12}
- c) Estirpes específicas. En una misma especie de hongos, no todas las estirpes se comportan de la misma forma. Así pues, la estirpe NRRL 1957 de *Aspergillus flavus* no produce aflatoxina, sin embargo ella es producida por otras estirpes como: NRRL 3251, NRRL 3357 y NRRL 3517.^{6,12}

1.5. Contaminación con micotoxinas de alimentos para animales.

En la actualidad la FAO estima que al menos el 25% de los cereales en el mundo están contaminados por micotoxinas conocidas, mientras que un porcentaje aun mayor podría estar contaminado por toxinas aun no identificadas.

En la producción, para obtener productos de origen animal de mayor calidad en un menor tiempo y con un menor costo, se hace uso de la nutrición en la cual se formulan dietas más eficientes, estas, se producen con una gran cantidad de ingredientes pudiendo ser de diferente origen, que va desde una diversidad de cereales (maíz, sorgo, avena, etc.), hasta subproductos industriales como las pastas de oleaginosas y diferentes

tipos harinas (carne, hueso, pluma, sangre). Esta gran diversidad de ingredientes puede conllevar al problema de incluir en las dietas ingredientes que pueden estar contaminados con micotoxinas, o bien, después de ser elaborado el alimento, éste también es susceptible a la contaminación con micotoxinas.

La contaminación se puede presentar en cualquiera de las siguientes etapas:

- a) Contaminación en el interior de la fábrica. En la fábrica de alimentos y a lo largo del proceso de elaboración, el polvo de las materias primas y de los alimentos, se puede quedar adherido a las paredes de los silos, transportadores, tolvas o mezcladores, este polvo puede proceder de ingredientes contaminados y ya sea por una falta de limpieza y desinfección periódica o porque algunas partes de la instalación de la fábrica son muy difíciles de limpiar, este polvo se puede quedar adherido por mucho tiempo.⁶ En las condiciones adecuadas de humedad y temperatura, el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas pueden tener lugar en el polvo acumulado, dando lugar así, a un proceso de contaminación que afectara a la calidad de las materias primas que pasan diariamente por estos focos contaminados, repercutiendo así en la calidad y conservación del producto alimenticio final.^{6, 12}
- b) Contaminación en el exterior de la fábrica. Un alimento puede estar en buenas condiciones a la salida de la fábrica, pero sin embargo se puede contaminar durante el transporte o en la misma instalación por problemas de residuos contaminados en el interior de los silos, así como por falta de higiene en las diversas áreas de la explotación.⁶

Son varios los metabolitos secundarios de los hongos que son considerados como micotoxinas (Tabla 3), sin embargo la micotoxina más importante es producida por el género *Aspergillus*.

1.6. El *Aspergillus*.

El *Aspergillus* es un hongo filamentoso, cosmopolita y ubicuo encontrado en la naturaleza, se puede aislar comúnmente del suelo, de raíces de plantas y del aire

ambiental. Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales, también producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas, algunas especies, por ejemplo *A. niger* *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones. Se conocen alrededor de 900 especies de *Aspergillus*, siendo los más comunes *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* y *A. niger*.¹⁶

Tabla 3. Micotoxinas más importantes y su hongo productor.⁵⁻¹²

Hongo	Micotoxina
<i>Aspergillus flavus</i> Link	Aflatoxinas
<i>Aspergillus nomius</i>	
<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	
<i>Fusarium graminearum</i>	Desoxinivalenol
<i>Alternaria alternata</i>	Fumonisin
<i>Fusarium verticilloides</i>	
<i>Fusarium moniliformi</i>	Moniliformina
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A
<i>Penicillium viridicatum</i>	
<i>Aspergillus clavatus</i>	Patulina
<i>Fusarium poae</i>	Toxina T-2
<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona

1.6.1. Clasificación Taxonómica.¹⁶

Reino: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Orden: *Eurotiales*

Familia: *Trichocomaceae*

Género: *Aspergillus*

1.6.2. Características morfológicas.

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos, poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el sustrato. En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide, en algunos aspergilos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos.¹⁶

Las características macro y micromorfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, así como la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar los aspergilos en secciones o grupos.¹⁷

Tabla 4. Características de los grupos de *Aspergillus* más importantes.^{17,18}

Sección	Grupo	Conidios	Métula	Vesícula	Conidióforo
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	Verde, pardo	Si/No	Globosa	Rugoso
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	Verde azulado	No	Espatulada	Liso
<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	Negro	Si/No	Globosa	Liso
<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	Canela, pardo	Si	Globosa	Liso

1.6.3. Características para su desarrollo.

La ubicuidad de los aspergilos es debida a su capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre sustratos con diverso contenido de humedad. La colonización de los granos durante el almacenamiento por *Aspergillus* y otros mohos se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa se eleva sobre el 70% sin que se desencadene aún el fenómeno de brotación.¹⁹

El rango de temperatura para su crecimiento va desde 0-5°C, estando el óptimo entre 30-33°C para la mayoría de las especies. Si unos granos con un contenido de humedad del 15% no fueron afectados por los aspergilos durante un año es porque la temperatura de almacenamiento estuvo por debajo de 5-10°C.²⁰

Tabla 5. Temperatura y AW requeridas para los *Aspergillus* más importantes.²⁰

Especies	Temperatura °C		AW	
	Rango	Óptimo	Mínimo	Óptimo
<i>A. flavus</i>	6 - 45	35 - 37	0,78	0,95
<i>A. fumigatus</i>	10 - 55	40 - 42	0,85	0,98 - 0,99
<i>A. versicolor</i>	4 - 39	25 - 30	0,78	0,95

1.6.4. Cultivo *in vitro*.

La mayoría de las especies crecen sobre medio Papa-Dextrosa, pero los aspergilosmófilos, particularmente los miembros de las secciones *Aspergilli* y *Restricti*, se desarrollan sobre Czapek-20% Sacarosa. La temperatura de incubación es de 25°C pero para algunos miembros de la sección *Fumigati* es de 37°C. La ornamentación de los conidios cambia con la edad y en unas dos semanas las esporas están totalmente maduras.¹⁶

Para el aislamiento se usan medios selectivos (Rosa de Bengala, Rosa de Bengala-Diclorán) con inhibidores de la proliferación bacteriana y del desarrollo de algunos mohos dando oportunidad a todas las esporas de originar una colonia, aunque restringida si el número es demasiado grande; si solo interesa determinar la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* se suele sembrar sobre el medio AFAP que es selectivo para dichas especies. Con el fin de identificar los aspergilos se suele sembrar en placas de Malta-Glucosa, Czapek-Levadura, Czapek- Glicerol o Czapek-20% Sacarosa incubando a 5, 25 y 37°C registrando las características macro y micro-morfológicas.²¹

1.7. Aspergilosis.

La aspergilosis es una micosis respiratoria en animales domésticos, principalmente en aves, la cual se caracteriza por una infección de la parte superior del

tracto respiratorio y con complicaciones en parénquima pulmonar, en donde el hongo se adapta e invade el órgano; existe también la aspergilosis conjuntival que de manera ocasional afecta los órganos viscerales y el sistema nervioso central. La aspergilosis es provocada principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* y *A. nidulans*.^{22,23}

Una de las vías de infección es la respiratoria, donde la contaminación del suelo es la causante, sin embargo la infección por vía digestiva es de mayor importancia ya que se puede originar por la ingestión de alimentos contaminados, donde los granos son el sitio de invasión por los hongos contaminantes.^{22,23}

Es importante resaltar que la mayoría de los *Aspergillus* son oportunistas y varias especies de estos son capaces de producir micotoxinas.

1.8. Micotoxinas producidas por *Aspergillus*.

Las principales micotoxinas producidas por *Aspergillus* son las aflatoxinas aunque también producen ocratoxinas, patulina y el ácido penicílico, sin embargo aunque todas estas son importantes, las aflatoxinas son las micotoxinas más importantes hasta ahora descubiertas, por su recurrencia y los daños que causa.²²

1.9. Las aflatoxinas.

Las aflatoxinas son producidas por *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare, estas sustancias pueden causar enfermedad y muerte, tanto en animales como en los seres humanos. Son aisladas frecuentemente de alimentos como maíz, arroz, cacahuates, etc.

Las aflatoxinas son las micotoxinas más estudiadas y controladas; toxicológicamente se consideran como unas toxinas muy potentes, relacionadas con la aparición de cáncer, mutaciones y alteraciones en el desarrollo fetal. Experimentos realizados en animales han demostrado que las aflatoxinas pueden producir toxicidad aguda y crónica. Los efectos agudos incluyen hepatitis, necrosis hepática, nefritis y congestión pulmonar, mientras que los efectos crónicos incluyen daño celular,

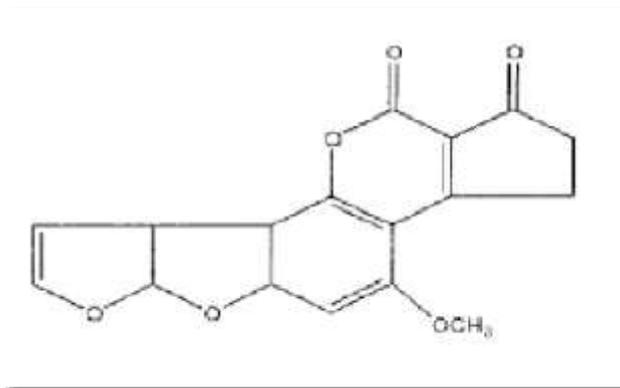
carcinogénesis, teratogénesis y mutagénesis. Las principales aflatoxinas son cuatro: AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.^{24,25}

Se generan por la vía biosintética de los poliquétidos a partir de acetatos. Sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350 Daltons, todas contienen en su molécula una mitad dihidrofurano unida a un anillo cumarina y a una estructura pentanona en el caso de las aflatoxinas B, que está sustituida por una lactona de seis miembros en las aflatoxinas G y son fuertemente fluorescentes bajo luz ultravioleta, habiéndose aprovechado esta propiedad como base de sus procedimientos analíticos. Además de esta propiedad, el furano de la estructura de las aflatoxinas es esencial para la actividad tóxica y cancerígena y por otra parte, la presencia del doble enlace en el anillo furano terminal es un determinante fundamental de la potencia, en particular para los efectos agudos y crónicos, disminuyéndola notablemente cuando no está en la molécula. Las propiedades anticoagulantes que posee la AFB₁ se las aporta la cumarina (Figura 2).²⁶

A. flavus y algunas cepas de *A. caelatus* solo producen aflatoxinas B₁ y B₂ mientras que *A. parasiticus* y *A. nomius* forman además aflatoxinas G₁ y G₂.^{27,28}

Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia (Blue y Green) observada bajo luz UV de onda larga mientras que los subíndices 1 y 2 indican componente mayor y menor respectivamente. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son el producto metabólico hidroxilado de las B₁ y B₂, alrededor del 1% de la aflatoxina B₁ consumida con el forraje es excretada en leche como M₁.²⁹

Figura 2. Fórmula química de la aflatoxina B₁.²⁶



Klitch, 2000

La temperatura optima para la producción de aflatoxinas varia de 7.5-12 °C o bien de 40-41°C según la cepa del hongo. Una humedad relativa menor del 85 % detiene el crecimiento de los hongos productores de estas toxinas, lo que corresponde a un contenido de humedad del más de 16 % y un AW igual a 0.85. Además de la temperatura y la humedad, la producción de aflatoxinas depende de varios factores: la cepa del hongo, el substrato y la microflora asociada.²⁹

Al ir creciendo el hongo existe poca o ninguna producción de aflatoxinas, pero al disminuir los niveles de fosfatos y nitrógeno en el medio, el metabolismo primario se desorganiza, se acumulan varios metabolitos primarios y se empiezan a producir las aflatoxinas. Existen cepas en las que no se producen estas toxinas, por lo que se asume que estos metabolitos no son esenciales para su desarrollo.^{30,31}

Se desconoce el papel fisiológico del metabolito en el desarrollo del hongo. Sin embargo, se ha establecido que existe una asociación entre la biosíntesis de aflatoxinas y la de los lípidos, y que además en algunos casos, la síntesis de proteínas disminuye durante la fase de producción de aflatoxinas.^{30,31}

Las aflatoxinas se consideran los contaminantes biológicos de los alimentos más extendidos a nivel mundial y los más peligrosos que se conocen debido a sus propiedades cancerígenas, mutágenas y teratógenas.³¹

1.9.1. Metabolismo de las aflatoxinas.

Se sabe que prácticamente todos los seres vivos son susceptibles a las aflatoxinas, sus efectos pueden ser agudos o crónicos según el organismo afectado, la dosis, frecuencia de exposición, especie, edad, dieta y la ruta de ingestión.³²

Para que las aflatoxinas puedan causar daño es necesaria la interacción con el hospedero, es necesario que ingiera alimento contaminado con las aflatoxinas y así se lleven a cabo la absorción, distribución, biotransformación y la acumulación residual dentro de un organismo. De todas la aflatoxinas la AFB₁ se considera la más tóxica.³²

Absorción. Las aflatoxinas se absorben por vía digestiva, seguida por la respiratoria y la cutánea, ya que las aflatoxinas al ser compuestos liposolubles son muy fácilmente absorbibles. La vía digestiva es la principal vía de absorción ya que las aflatoxinas son importantes contaminantes de los alimentos, la absorción a nivel del intestino delgado es por difusión pasiva y depende de la composición lipídica del epitelio intestinal, posteriormente llegan a circulación sanguínea y se distribuyen hacia los tejidos blandos y depósitos de grasa, la mayor acumulación se presenta en los órganos involucrados en la biotransformación y eliminación de los alimentos, como el hígado y el riñón.^{33,34}

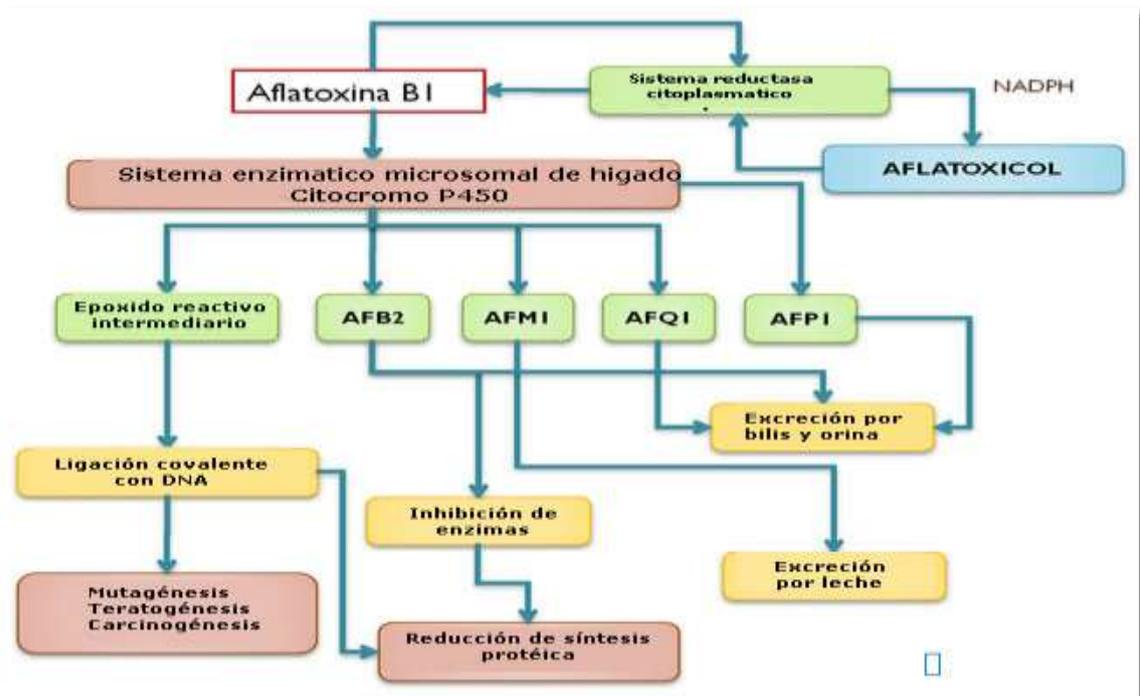
Biotransformación. La biotransformación se lleva a cabo principalmente en el hígado por la enzima citocromo P450 mitocondrial en un metabolito hidrosoluble, dando origen a la aflatoxina M₁, Q₁ y P₁ (Figura 3), todos estos metabolitos tienen la característica de ser menos tóxicos que las aflatoxinas. Existen otras reacciones de biotransformación en las cuales intervienen enzimas no microsomales, como es el aflatoxicol que se biotransforma por enzimas localizadas en el citosol, así mismo, en el tracto gastrointestinal puede llevarse a cabo una biotransformación, generando AFB₁-epóxido, dihidrodiol-AFB₁ o AFB₂ que son capaces de interactuar con proteínas intestinales. La conversión de AFB₁ a aflatoxicol se logra mediante una reductasacitosólica; el aflatoxicol se considera que es igual de tóxico y cancerígeno como la AFB₁, pero su capacidad mutágena es menor, según esto, se formó la hipótesis de que el aflatoxicol puede permanecer como un “reservorio” de AFB₁, se encontró que si el aflatoxicol sufre una re-oxidación por la enzima deshidrogenasa microsomal adquiere nuevamente su conformación de AFB₁ confirmando la hipótesis de que puede permanecer como reservorio.^{32,33,34,35,36}

Bioquímicamente, las aflatoxinas son consideradas como inhibidores biosintéticos y pueden alterar el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, así como el metabolismo energético, altas dosis pueden provocar una inhibición total de los sistemas bioquímicos; en el caso de la AFB₁ se ha encontrado que su actividad biológica puede tener varias fases:^{36,37}

- a) Interacción con el DNA e inhibición de las polimerasas responsables de la síntesis de DNA y RNA

- b) Supresión de la síntesis del DNA
- c) Reducción de la síntesis del RNA e inhibición del RNA mensajero
- d) Alteraciones en la morfología del nucléolo
- e) Reducción de la síntesis de proteínas

Figura 3. Biotransformación de la aflatoxina B₁.³⁶



Yunnus, 2011

El metabolismo de los carbohidratos también se ve afectado, inhibe la síntesis de glicógeno a través de la acción sobre las enzimas glicógenosintetas y transglucosilasa.

Otro de los problemas que ocasionan las aflatoxinas es el de incrementar el nivel citosólico del NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos, por lo que se produce una acumulación de lípidos en el hígado.³⁸

La interacción de las aflatoxinas con los ácidos nucleicos se da de dos tipos: uno de ellos es por medio de uniones no covalentes, las cuales son débiles y reversibles; el otro tipo es con uniones covalentes formando enlaces muy fuertes e irreversibles, permitiendo así la formación de complejos DNA-Aflatoxina que se conocen como aductos. Estos aductos son el resultado de la acción enzimática del P450, por lo que hace a las células hepáticas las más susceptibles por su alto contenido de esta enzima.³⁹

La formación de aductos se da de la siguiente manera:

- Intercalamiento de la toxina en la estructura helicoidal del DNA.
- Oxidación de los carbonos no saturados (C5 y C9) de la parte terminal furano de la molécula de AFB₁ por el sistema microsomal de oxidasas de función mixta para formar un intermediario.
- El ataque del C5 de AFB₁ sobre el N7 de la guanina y la formación de un aligadura covalente en la interacción AFB₁-N^r-Guanina.

El daño en la molécula de DNA por esta interacción se puede manifestar de varias maneras: el aducto es cortado de la molécula de DNA y se inducen errores en el mensaje o el aducto no es cortado pero es convertido en AFB-formamidopirimidina que también es causa de errores en la transcripción. Como consecuencia del daño al DNA se origina la mutagénesis y carcinogénesis y mientras que si se trata de un feto se presentara una teratogénesis.⁴⁰

Para ser eliminadas las aflatoxinas de manera general, se conjugan con ácido glucorónico y taurocólico para poder ser eliminadas por bilis y en menor grado también son eliminadas a través de riñón y aparato gastrointestinal.⁴¹

1.9.2. Toxicidad.

Se ha identificado a la aflatoxina B₁ como la micotoxina más tóxica para varias especies animales y para el hombre. Las especies más susceptibles a AFB₁ son los patos, conejos y gatos; las especies de aves más sensibles son los patos seguidos de los pavos, gansos, faisanes, pollos de engorda y gallinas (Tabla 6). La toxicidad de las aflatoxinas va a depender de la dosis, del tiempo de exposición y la especie involucrada, y gracias a esto se pueden distinguir los procesos agudos de los procesos crónicos.⁴²

1.9.3. Aflatoxicosis en aves.

Se conoce como aflatoxicosis a la enfermedad producida por la ingesta de aflatoxinas, en general, para que se de la intoxicación con aflatoxinas es importante conocer el tipo de aflatoxina, la dosis, tiempo de exposición, línea, estirpe, sexo y edad del animal expuesto.

Tabla 6. DL50 en varias especies animales.⁴²

Especie	DL50 mg/Kg
Pollo	6.30
Pato	0.43
Conejo	0.30
Gato	0.55
Cerdo	0.60
Perro	0.50-1.00
Oveja	1-2
Rata	5.50-7.20
Macaco	7.80
Hamster	10.20

La aflatoxicosis altera los parámetros productivos como ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia, pigmentación, producción de huevo y rendimiento reproductivo, además tiene un efecto inmunodepresor y cancerígeno. Algunas de estas alteraciones son influenciadas directamente por la intoxicación, aunque otras son indirectas, causadas generalmente por la disminución en el consumo de alimento.⁴²

Uno de los mayores efectos de las aflatoxinas es la toxicidad hacia varios órganos, principalmente el hígado, esto va a depender de la duración en la exposición, así como la concentración de la toxina, dado esto, puede presentarse una intoxicación aguda o crónica. Una exposición crónica a bajos niveles de aflatoxinas es mucho más frecuente que una exposición aguda y los animales presentan reducción en la eficiencia productiva. Las aflatoxinas producen a corto plazo, efectos hepatotóxicos e hiperplasia en los conductos biliares así como lesiones renales, mientras que a largo plazo poseen capacidad inmunosupresora, cancerígena, teratogénica y mutagénica.⁴³

Existen muchos factores que influyen en la susceptibilidad, por ejemplo los pollos destinados para carne son más susceptibles durante la primera semana de edad y los machos son más susceptibles que las hembras.⁴⁴

Una situación importante a considerar es el periodo en el que reciben aflatoxinas los pollos, así cuando el tiempo de intoxicación es de 7 días será necesaria una mayor concentración de micotoxina en el alimento para observar detrimento de los parámetros productivos, mientras que cuando los pollos consumen durante 7 semanas será suficiente niveles más bajos para observar problemas productivos.

Un factor concomitante que produce la aflatoxicosis, es que las aves incrementan la susceptibilidad a otras enfermedades y también se observa una pobre respuesta inmune después de las vacunaciones, lo cual provoca reducción en el rendimiento productivo y mayor mortalidad.⁴⁴

1.9.3.1. Signos clínicos

A continuación se hace mención a diferentes autores con los resultados de sus trabajos:

Quist, 2000⁴⁵. En pavos de 14 días de edad con tiempo de consumo de 35 días a dosis de entre 100 y 800 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso vivo, se encontró reducción en la ganancia de peso y lesión hepática microscópica; en pavipollos a dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso vivo, se encontró reducción de la eficiencia a la vacunación de Marek.⁴⁵

Doerr, 1983⁴⁶. En pollo de engorda de un día de edad con tiempo de consumo de 7 semanas a dosis de 75 a 675 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso vivo, se encontró retraso en el crecimiento en la dosis baja y aumento en la mortalidad en la dosis alta.⁴⁶

Rao, 1993⁴⁷. En pollos de engorda con una dosis de 4 ppm de AFB_1 se encontró pérdida de peso, retardo del crecimiento, alta mortalidad, y aumento de la conversión alimenticia.⁴⁷

1.9.3.2. Alteraciones morfológicas.

El hígado es el órgano diana de las aflatoxinas aunque también otros órganos y sistemas se ven afectados por estas.

Hígado: se observa decoloración pálida amarilla-verdosa y con el tiempo desarrolla focos blanquecinos, hemorragias petequiales o equimóticas, en ocasiones hematomas, puede estar aumentado de tamaño cuando el curso es agudo o atrofiado con fibrosis abundante cuando es crónico. Histológicamente los hepatocitos presentan degeneración grasa, hiperplasia de los conductos biliares, fibrosis perilobulillar y focos necróticos, a su vez, se observa la presencia de células inflamatorias como heterófilos y mononucleares en el espacio porta.⁴⁸

Riñón: se observa con tonalidades pálidas blanquecinas o amarillentas, difusas, que corresponden a necrosis tubular o degeneración grasa y se describe también la presencia de infiltración linfoide.⁴⁸

También se ha descrito cardiomegalia, atrofia de bolsa cloacal, timo y bazo con depleción linfoide, otros hallazgos son atrofia de médula ósea observándose de color blanquecino y petequias y equimosis en masas musculares.⁴⁹

1.9.3.3. Alteraciones en pruebas de laboratorio.

A nivel sanguíneo la aflatoxina B₁ presenta un anillo dicumarínico muy similar al que presenta la vitamina K y actúa suplantándola y mimetizándola, lo que ocasiona hemorragias y descenso del hematocrito.^{46, 47}

Doerr, 1983⁴⁶. Observo una disminución del 43% en la concentración de proteínas plasmáticas al administrarse 2.2 g/Kg de peso vivo (los niveles normales de proteína sérica en aves son entre 3.0 y 6.0 g/dl), también describen una disminución del 64% de colesterol sanguíneo, así mismo, describieron una disminución de proteínas específicas que actúan en la coagulación, con su consecuente aumento en el tiempo de coagulación.⁴⁶

Kumar, 1993⁴⁹. Los niveles séricos de la AspartatoAminotransferasa (AST), AlaninaAminotransferasa (ALT), Lactato Deshidrogenasa (LDH) y Gamma Glutamilttransferasa (GGT) se ven afectados al utilizar dosis de 0.5 ppm, 2.5 y 5 ppm de AFB₁.⁴⁹

La respuesta inmune también se ve afectada por la presencia de las aflatoxinas, el efecto negativo sobre el complemento, interferón, proteínas séricas y actividad leucocitaria son resultado de la lesión hepática y de la inhibición de la síntesis de proteínas.⁵⁰

1.9.3.4. Respuesta Inmune.

La aflatoxina B₁ tiene los efectos más potentes dentro de las micotoxinas, su mecanismo principal en cómo actúan a nivel celular, es la capacidad que tienen de unirse al ADN y al ARN por medio de la formación de aductos, afectando así, la proliferación y diferenciación de las células del sistema linfoide y la síntesis proteica de las células, afectando así la producción de polipéptidos como monocinas, interleucinas y factores del complemento que regulan el sistema inmune y así mismo la síntesis de anticuerpos.^{49, 50}

También se pueden producir efectos histopatológicos significativos como hiperplasia de los conductos biliares, inflamación en hígado y riñón, depleción linfoide y atrofia de los órganos del sistema inmune (Bolsa cloacal, bazo, timo), igualmente, las aflatoxinas pueden llegar hasta el embrión comprometiendo así su sistema inmune, haciéndolos más susceptibles a patógenos, repercutiendo en una disminución de la respuesta a los programas de vacunación.⁵⁰

Los análisis de inmunoglobulinas han demostrado un impacto de la aflatoxina sobre los niveles de IgA e IgM, en animales que consumieron alimento contaminado se ha reportado una reducción en los títulos de anticuerpos frente a enfermedades como Newcastle, bronquitis y gumboro en gallinas ponedoras.⁴⁹

1.9.4. Detección de micotoxinas en los alimentos.

Desde los años 60's, las micotoxinas fueron reconocidas como una gran amenaza a la salud humana y animal, además de que generalmente representan grandes pérdidas económicas, así, el desarrollo de métodos o técnicas para poder detectar la contaminación con micotoxinas es de suma importancia. Para determinar la contaminación de un alimento por micotoxinas, existen diversos métodos, según se

requiera rapidez, precisión o confiabilidad. Existen métodos presuntivos, cualitativos, cuantitativos y confirmatorios.⁵¹

Existen métodos altamente probados para la detección, se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Basados en HPLC (High Performance Liquid Chromatography)
- Basados en ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- Basados en Cromatografía de columnas de inmunoafinidad

Estos métodos tienen grados variables de detección y cuantificación, dependiendo del tipo de alimento que se quiere analizar y el tipo de micotoxina a encontrar.

Métodos basados en HPLC. En esta técnica, el compuesto pasa por una columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (cilindro con pequeñas partículas redondeadas con características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil; El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo.⁵²

Las desventajas de este método radican en el alto costo del equipo que se utiliza, sin embargo los reactivos usados no son tan costosos como en otras técnicas. La ventaja principal de esta técnica es que es muy exacta para conocer las diferentes micotoxinas presentes en la muestra, además también tiene alto grado de sensibilidad para cuantificar cada componente.^{52,53}

Métodos basados en ELISA. Ya que las micotoxinas no son antigénicas, los primeros estudios fueron dirigidos a lograr la conjugación con proteínas o polipéptidos que pudieran servir como transportadores en las condiciones óptimas de producción de anticuerpos en conejos y en otros animales. Con los avances tecnológicos se han logrado producir anticuerpos monoclonales contra diversas micotoxinas.^{53,53}

Gracias a estos avances se han logrado diseñar ensayos inmunológicos para la determinación de micotoxinas, tanto en métodos de ELISA como en columnas de inmunoafinidad. En general, dos sistemas de ELISA se han usado para el análisis de micotoxinas, un sistema es ELISA directo, donde se utiliza un conjugado enzima-micotoxina y el otro, es ELISA indirecto, se utiliza un conjugado proteína-micotoxina y un anticuerpo secundario con el cual una enzima ha sido conjugada. Generalmente la peroxidasa de “horseradish” es la enzima más comúnmente utilizada para la conjugación, otras enzimas que también se utilizan son la fosfatasa alcalina y la β -galactosidasa. En el ensayo directo, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida en esferas o tubos de poliestireno, esferas de nylon o tarjetas de material plástico, o bien placas para microtitulación. La muestra en solución o el estándar de toxina es generalmente incubada simultáneamente con el conjugado enzimático. Después de los lavados apropiados, la cantidad de enzima conjugada que reacciona con el anticuerpo se determina por incubación con un sustrato en solución que contiene peróxido de hidrógeno que actúa como un oxidante cromógeno, el color resultante se mide visualmente o por medio de un espectrofotómetro. En este ensayo, las toxinas presentes en el extracto de la muestra y los conjugados enzimáticos de las toxinas compiten por los mismos sitios de enlace presentes en el anticuerpo inmovilizado en la superficie sólida. Debido a que las concentraciones de conjugado enzimático y de anticuerpo son constantes, la intensidad del color es una función inversamente proporcional a la concentración de toxina.^{53,54,54}

En el ensayo indirecto un conjugado formado por la micotoxina enlazada a una proteína o un polipéptido se inmoviliza en una placa de microtitulación, esta, se incuba con el anticuerpo específico en presencia de las micotoxinas homólogas. La cantidad de anticuerpo enlazado al conjugado proteínico inmovilizado en la placa es determinado después por la reacción con un complejo enzimático IgG y por la subsiguiente reacción

con el sustrato, de esta forma la toxina en las muestras y la toxina en la fase sólida compiten con los mismos sitios de unión con el anticuerpo específico en solución.^{54,55}

Métodos basados en Cromatografía de columnas de inmunoafinidad. Los métodos de columnas de inmunoafinidad se han vuelto más comunes en la actualidad, por su sencillez de uso y por su exactitud en la detección, además del bajo costo del material de laboratorio y reactivos usados.⁵³

En estos procedimientos los anticuerpos monoclonales específicos para una micotoxina en particular, se inmovilizan formando un gel, que se empaca en una columna, cuando el extracto de un alimento terminado se hace pasar a través de la columna, la micotoxina queda combinada con los sitios de unión del anticuerpo, mientras que el resto de los componentes del extracto no se combinan, después de esto se procede a eliminar cualquier compuesto que haya quedado retenido con una serie de lavados, posteriormente se eluye la micotoxina con una solución metabólica, la solución resultante se pasa a través de un sistema por cromatografía de líquidos o bien se derivatiza y se lee en un fluorómetro especial.^{53,54,55}

1.9.5. Control y prevención.

Teniendo en cuenta los riesgos que representan las micotoxinas sobre la salud pública, diferentes organismos a nivel mundial (OMS, FAO, FDA), han establecido límites en el contenido de micotoxinas en los alimentos para humanos y animales. El establecimiento de estas directrices ha facilitado el comercio y la adopción de medidas entre los diferentes países. Los primeros límites fueron fijados para las aflatoxinas y para el año 2003 ya había 100 países con regulación de micotoxinas para alimentos e ingredientes para la alimentación animal.⁵⁵

Las recomendaciones para la prevención y reducción de las micotoxinas en los ingredientes destinados a la alimentación animal, las podemos agrupar en buenas prácticas de manejo de los cultivos y en el “Protocolo de Establecimiento de Puntos Críticos y de Control de Riesgos” (HACCP). Sin embargo, en la práctica es difícil controlar todos los factores y especialmente los ambientales, con las siguientes estrategias se puede reducir la carga de micotoxinas en las materias primas y alimentos:

Estrategias agronómicas.Reducir el estrés de las plantas, control de insectos, eliminación de residuos vegetales y rotación de terrenos, utilización de agentes antifúngicos y desarrollo de variedades de plantas resistentes a la contaminación fúngica.⁵⁶

Estrategias posteriores a la cosecha.Control medioambiental de conservación como contenido de agua, presión de O₂ y temperatura, control de plagas (insectos y roedores), separar granos partidos y cosechas dañadas antes de su almacenaje y utilizar inhibidores fúngicos, como el ácido propiónico.⁵⁶

Sin embargo, una vez que las micotoxinas han contaminado un ingrediente o un alimento, resulta muy difícil lograr su eliminación; por lo que es necesario recurrir a diferentes medios para neutralizarlas o por lo menos minimizar su concentración. Para realizar el control y eliminación de las micotoxinas es necesario saber cuál o cuáles son las toxinas de mayor incidencia, conocer su estructura y su capacidad de reacción frente a otras moléculas, que las pueda hacer menos tóxicas o completamente inocuas.⁵⁶

Los métodos utilizados para este propósito se pueden agrupar en físicos, químicos y biológicos.

Algunos métodos físicos utilizados son la inactivación de las micotoxinas con temperaturas altas, los rayos UV y X o las irradiaciones con microondas; otros métodos que pueden resultar efectivos son la limpieza de los granos o su fraccionamiento.

Entre los métodos químicos, se ha utilizado la amonización y otros agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno y ozono, así como algunos ácidos y álcalis.

La descontaminación biológica mediante la utilización de microorganismos es otra de las estrategias utilizadas. Algunas bacterias lácticas o levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizan ampliamente en la fermentación de los alimentos poseen estructuras en la pared celular con capacidad para adherir micotoxinas.⁵⁷

1.10. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Las levaduras son microorganismos eucariotas y sus propiedades son completamente diferentes a las de las bacterias. Por ejemplo, las levaduras son resistentes a los antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacteriales. Esta resistencia es genéticamente natural y no es susceptible a ser modificada o transmitida a otros microorganismos. El tamaño de las levaduras varía alrededor de $5 \times 10 \mu\text{m}$ y es también significativamente mayor al de la bacteria.⁵⁸

Dentro de las especies de hongos unicelulares clasificados genéricamente como levaduras se encuentra incluido a *Saccharomyces cerevisiae*, las levaduras de este género son capaces de llevar a cabo procesos de fermentación a partir de la transformación de azúcares a etanol y dióxido de carbono, dichas propiedades han sido ampliamente investigadas y explotadas desde hace muchos años en la industria de la producción de pan y bebidas alcohólicas. Otras aplicaciones importantes de estas levaduras, incluyen su empleo en modelos biológicos enfocados a elucidar procesos básicos de fisiología celular y su utilización de forma intensiva en el área biotecnológica. Por otro lado, algunas levaduras del género *Saccharomyces* muestran una gran capacidad para neutralizar toxinas de *Clostridium*, característica que ha sido aprovechada en la terapéutica humana para controlar diarreas ocasionadas por una prolongada medicación con antibióticos por vía oral.^{59,59,60}

A escala nutricional, las levaduras son capaces de metabolizar y transformar de forma natural minerales inorgánicos hacia formas orgánicas, siendo este, un proceso similar al que realizan las plantas. Cuando un individuo consume las células de levaduras muertas, estas pueden aportarle diversos nutrientes a parte de los minerales, como es el caso de proteínas, péptidos y vitaminas, previo al descubrimiento de las vitaminas del complejo B, las levaduras de cervecería se utilizaban como un complemento alimenticio para monogástricos. En la actualidad, células de levaduras vivas continúan adicionándose a dietas para animales con la finalidad de mejorar su salud y productividad, sobretodo en rumiantes. Gracias a sus propiedades nutricionales y farmacéuticas, las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* han sido aprobadas como un microorganismo seguro para su empleo en la alimentación animal (Figura 4).^{61,62}

1.10.1. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reino: *Fungi*

División: *Ascomycota*

Clase: *Hemiascomycetes*

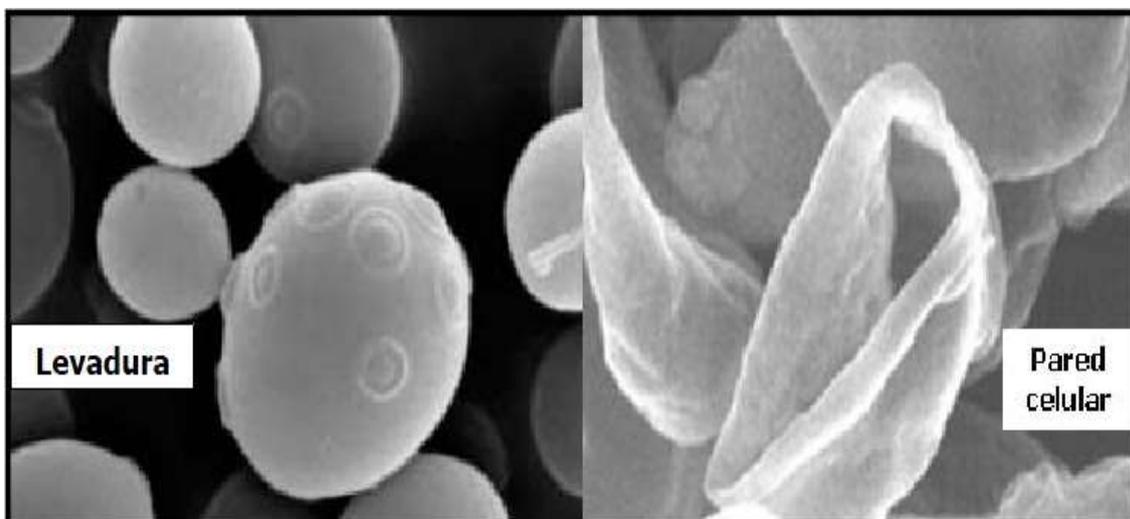
Orden: *Saccharomycetales*

Familia: *Saccharomycetaceae*

Género: *Saccharomyces*

Especie: *S. cerevisiae*

Figura 4. Microfotografía electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae*.⁶²



Cuarón, 2000

1.10.2 Fracciones de levaduras.

Un tipo de productos derivados de las células de levaduras son los conocidos como extractos o autolizados de levadura y las paredes celulares de levaduras (**PCL**), productos obtenidos a partir de la autólisis de la célula completa de la levadura. En el área de la alimentación animal, desde la década pasada se ha incrementado el interés por la utilización en la dieta de fracciones de paredes celulares de levadura como fuente de polisacáridos del tipo β -glucanos y mannano-oligosacáridos, este tipo de polisacáridos son reconocidos como aditivos naturales capaces de ejercer efectos benéficos en la salud y productividad del individuo. En la industria avícola, polisacáridos de tipo β -glucanos procedentes de PCL de *Saccharomyces cerevisiae* son utilizados como

inmunoestimulantes para incrementar la supervivencia de estos animales bajo condiciones de estrés.⁶³

1.10.3. Fabricación industrial de PCL y extractos de levaduras.

La producción de PCL de levadura se realiza como un paso alterno y posterior a la producción industrial de las levaduras activas. Cuando la cantidad de levaduras es la adecuada dentro de los fermentadores, se realiza un proceso térmico que provocara la autólisis de las células de la levadura. A partir de aquí, se lleva a cabo un proceso de centrifugación del producto autolizado, lo que provocara la separación de la PCL y del contenido intracelular de la levadura. Posteriormente los productos separados son concentrados y secados para conservar sus características nutricionales (Figura 5).⁶⁴

1.10.4. Características de la PCL.

En la actualidad se ha incrementado el interés por el estudio de las fracciones o polisacáridos de las PCL como β -glucanos y mananos, ambas moléculas pueden mostrar efectos benéficos en la salud de los animales de producción, así como en los seres humanos. No obstante, las concentraciones de estos polisacáridos dentro de las PCL pueden verse modificadas por diversas circunstancias.

La PCL está constituida por polisacáridos y glicoproteínas en forma de una red tridimensional que funciona como una estructura altamente dinámica y adaptable al medio que la rodea (Figura 6). Las principales funciones de la PCL están encaminadas a garantizar la supervivencia de la célula, entre estas se pueden incluir:^{65,66}

- Mantiene las condiciones de estabilidad osmótica dentro de la célula.
- Mantiene la integridad y la forma celular durante los procesos de crecimiento y división.
- Limita la permeabilidad de macromoléculas a través de la pared celular y la blinda del ataque de proteínas externas.
- Evita el escape hacia el medio externo de moléculas solubles intermediarias durante la construcción de la pared celular.

- Crea los microambientes internos adecuados para la membrana celular durante las fases de estancamiento de los cultivos y colonias.

1.10.5 Composición de la PCL.

Estudios realizados con levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* sugieren que dependiendo de las condiciones de crecimiento, la PCL puede representar de un 10 a un 25% del total de la materia seca de la célula. En otros estudios donde fueron evaluadas diferentes especies de levaduras, se encontraron valores de porcentajes de materia seca de pared celular de un 26 al 32%, observándose diferencias de acuerdo a la especie de levadura. Se ha estimado que el porcentaje de polisacáridos que puede contener la PCL puede ser de alrededor de un 85 a un 90% y de un 10 a un 15% de proteínas. A escala estructural, la PCL está constituida por 3 grupos de polisacáridos:⁶⁷

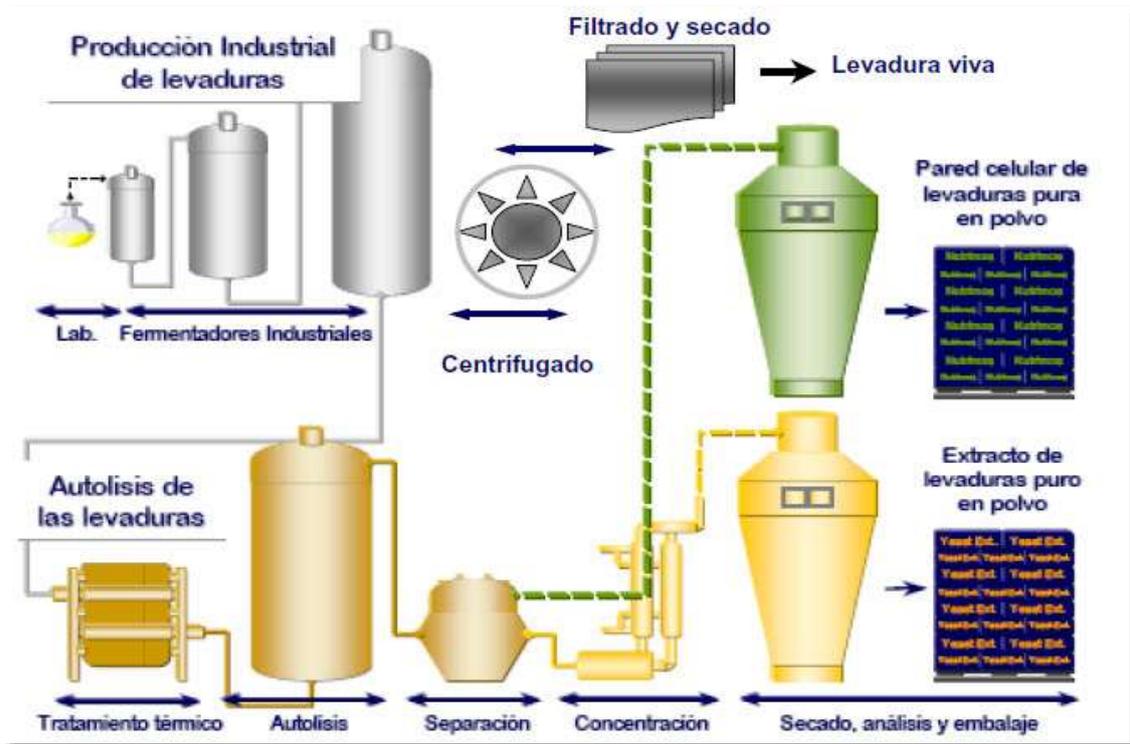
1. Polímeros de manosa o manano-proteínas, hasta un 50% de la materia seca de la PCL.
2. Polímeros de glucosa o β -glucanos, hasta un 55% de la materia seca de la PCL.
3. Polímeros de N-acetil-glucosamina o quitina en un 6% de la materia seca de la PCL.

1.10.6. Estructura de la PCL.

Los polisacáridos que constituyen la PCL, corresponden a moléculas de 1,3- β -glucanos, 1,6- β -glucanos, manano-proteínas y quitina, todos estos con diferentes grados de polimerización, tamaño y porcentajes dentro de la PCL. La capa interna de la PCL la componen moléculas de 1,3- β -glucanos moderadamente ramificados unidos por puentes de hidrógeno, que le proporcionan elasticidad a la red tridimensional que sirve de soporte a la capa externa constituida principalmente por manano-proteínas o capa protectora que se extienden hacia el medio externo de la célula (Tabla 7). De forma general, la conjunción de las 4 macromoléculas dentro de la PCL ocurre de la siguiente manera: la porción proteica de la manano-proteína se une a la macromolécula de 1,6- β -glucanos por medio de anclajes de tipo glicosilfosfatidilinositol que contienen 5

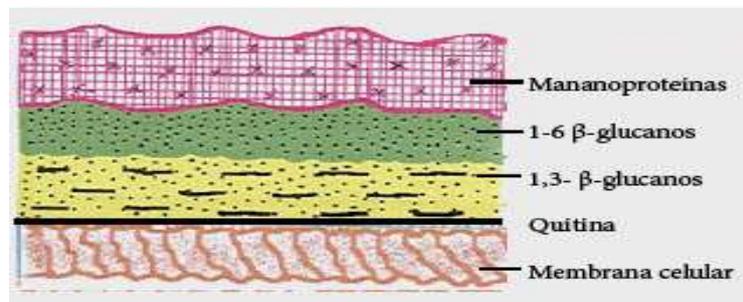
residuos de ligaduras α -manosil; la macromolécula de 1,6- β -glucano a su vez presenta ramificaciones con enlaces β (1,3), a escala de estas ramificaciones la quitina puede unirse a ella por medio de enlaces β (1,4) y β (1,2); finalmente, la porción terminal reducida del 1,6- β -glucano se conecta con la terminal no reducida de la glucosa terminal del 1,3- β -glucano.⁶⁷

Figura 5. Esquema de la producción industrial de levaduras y paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*.⁶⁵



Romero, 2003

Figura 6. Esquema de la estructura de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*.⁶⁵



Romero, 2003

Tabla 7. Macromoléculas y su porcentaje en la PCL.^{66, 67}

Macromolécula	% en la PCL
Manano-proteína	30-50
1,6-β-glucano	5-10
1,3-β-glucano	30-45
Quitina	1.5-6

1.10.7 Utilización de levaduras en la alimentación animal.

Desde hace 50 años en la industria de la alimentación animal, se han empleado antibióticos a dosis sub-terapéuticas con la finalidad de mejorar el crecimiento, la eficiencia alimenticia y la salud del animal, no obstante esta práctica está siendo cuestionada debido al creciente temor de la posible generación de genes de resistencia en bacterias digestivas para antibióticos empleados en terapéutica humana, situación que podría representar un gran riesgo para la salud pública. Debido a esta situación y a otras crisis alimentarias sufridas alrededor del mundo, la percepción del consumidor hacia los productos de origen animal se ha sensibilizado aún más, incrementándose las preferencias hacia los productos producidos de forma más natural y de mejor calidad. En el año 2006, en los países pertenecientes a la Unión Europea se llevó a cabo la prohibición total del empleo de antibióticos promotores del crecimiento en las dietas animales, y se espera que con el transcurso de los años esta tendencia se expanda por todo el mundo.⁶⁸

Bajo esta premisa, nuevas oportunidades quedan abiertas en la industria alimenticia para el desarrollo e investigación de sustancias naturales que puedan ser empleadas en la alimentación animal; como es el caso de las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* gracias a sus propiedades nutricionales y farmacodinámicas, su utilización en la alimentación animal y humana ha sido frecuente desde hace ya varios años. Las levaduras pueden constituir un buen complemento alimenticio ya que pueden proveer nutrientes como proteínas, minerales y vitaminas, en la alimentación animal, las levaduras han sido utilizadas mas frecuentemente en rumiantes, recientemente en alimentación para monogástricos, se ha incrementado el interés y la frecuencia del empleo de fracciones celulares o PCL. Parte de los beneficios que se le

atribuyen a las PCL, son de servir como fuentes de polisacáridos de tipo manano-oligosacáridos y β -glucanos.⁶⁹

Los mecanismos de acción específicos para los diferentes aditivos elaborados a partir de levadura y sus fracciones empleados en dietas animales no han sido claramente definidos; a pesar de esto, los beneficios obtenidos en la salud y productividad de los animales por su aplicación en la dieta están bien documentados. De acuerdo a algunos autores, en las mejoras observadas de productividad y salud de los animales que consumen levaduras podríamos incluir los de tipo directos e indirectos.⁶⁹

Como efectos directos se pueden incluir los de tipo nutricional, en concreto los ejercidos por los diversos nutrientes presentes en las células de levaduras, como proteínas, minerales, vitaminas, aminoácidos y péptidos, que pueden ser utilizados por el individuo cuando la levadura muere. Una hipótesis planteada, es la capacidad que presenta la levadura para producir numerosas enzimas (peptidasas, invertasas, proteasas, hidrolasas, maltasas, etc.), algunas de ellas pueden ser liberadas en el intestino y reforzar la acción de las enzimas endógenas, facilitando la digestión de la materia seca del alimento. Este mecanismo podría brindar mayores beneficios en rumiantes ya que en el caso de los monogástricos, no más del 30% de la energía neta para mantenimiento proviene de los productos de la fermentación y además en estas especies la composición de las dietas no impone una dependencia importante de la digestión fermentativa.^{62, 70, 71}

1.10.7.1. Utilización de PCL, manano-oligosacaridos y β -glucanos en la alimentación animal.

Las PCL son ricas fuentes de polisacáridos naturales del tipo β -glucanos y manano-oligosacáridos; investigaciones en el área de carbohidratos, sugieren que este tipo de moléculas cumplen funciones vitales en los procesos de comunicación a escala intestinal y del sistema inmune. En el caso concreto de las PCL, su utilización en la avicultura como aditivos alimenticios se remonta a inicio de los años 90's; hasta la fecha los beneficios observados en la productividad animal por la suplementación de manano-oligosacáridos en la dieta, muestran ser similares a los obtenidos con antibióticos promotores del crecimiento, la suplementación de manano-oligosacáridos

en dietas para aves y cerdos, ha reportado beneficios en términos de mejora en los parámetros productivos y de la salud del animal (Tablas 8 y 9).^{72, 72}

Una de las principales empresas que comercializa manano-oligosacáridos (MOS) realizó una serie de análisis estadísticos incluyendo pruebas en distintas especies, bajo diferentes condiciones experimentales y países. Hoogen el 2004⁷³ evaluó 29 pruebas realizadas con la utilización de MOS en dietas de pollos de engorda, los resultados de este análisis muestran que la utilización de MOS en la dieta representó mejoras respecto a los controles negativos de +1.61% en el peso final, -1.99 en el índice de conversión alimenticia y de -21.4% para la mortalidad. Los efectos generales observados por la utilización de MOS incluyen:⁷⁴

- Mejoras en los índices productivos
- Mayor resistencia ante infecciones bacterianas y coccidias
- Mayor índice de supervivencia

Tabla 8. Efectos de la incorporación de manano-oligosacáridos derivados de PCL en la dieta de pollos de engorda.^{74, 75,76,77,78,79}

Autor	Dosis Kg/Ton	Efecto con respecto al control negativo
Pettigrew (2000)	1.0 (1-42 d) 0.75 (42-63 d)	Sin efectos en la productividad y calidad de la canal del animal.
Hofacre et al. (2004)	2.0 + Bacterias lácticas	Menor mortalidad post-desafío con <i>Eimerias</i> y <i>C. perfringens</i> .
Jamroz et al. (2006)	1.0 (1-42 d) 2.0 (1-42 d)	Sin efectos en la productividad, menores recuentos de <i>E. coli</i> y coliformes en yeyuno.
Ao et al. (2004)	1.0 (1-21 d) 0.5 (21-35 d)	Incremento del peso vivo y uniformidad de la parvada.
Sun et al. (2005)	0.91 (14-28 d) 0.45 (28-49 d) + Bacterias lácticas	Menor % mortalidad e índice de conversión alimenticia similar al de las dietas con antibiótico promotor del crecimiento.
Kannan et al. (2005)	0.5 y 1.0 (1-35 d)	Menor % de deposición de grasa abdominal en la canal.

Tabla 9. Efectos de la incorporación de MOS derivados de PCL en la dieta de pavos.^{80,81,82,83}

Autor	Dosis Kg/Ton	Efecto con respecto al control negativo
Parks et al. (2002)	1.0 (1-6 sem)	Incremento del peso vivo, similar a dietas con antibióticos promotores de crecimiento.
	0.5(6-20 sem)	
Fairchild et al. (2001)	1.0 (1-3 sem)	Mayor peso vivo en condiciones normales y al ser desafiados con <i>E. coli</i> .
Sims et al. (2004)	1.0 (0-6 sem)	Menor recuento de <i>Clostridiumperfringens</i> y mayor de anaerobios y bífido bacterias en intestino grueso. Mayor peso vivo y efecto sinérgico a la incorporación de antibiótico promotor del crecimiento.
	0.5 (6-18 sem)	
Zdunczyk et al. (2004)	1.0 (1-8 sem)	No efecto en la productividad, modificación de la concentración de ácidos grasos volátiles de cadena corta en el ciego dependiendo de las dosis.
	2.5 (1-8 sem)	
	5.0 (1-8 sem)	

1.10.8.Mecanismos de acción de las levaduras y PCL adicionada en el alimento.

Se considera que *S. cerevisiae* es un microorganismo incapaz de colonizar el tracto digestivo por lo cual transita a lo largo de él pudiendo ejercer un efecto de barrera. De esta forma, la capacidad de acción de las levaduras en animales estará relacionada con el uso continuo y en cantidades suficientes. De acuerdo a Cuaronen 2000⁶², los efectos de promoción del crecimiento de la levadura en animales monogástricos, podrían explicarse por el control de patógenos o efecto profiláctico que pueden ejercer las levaduras ante infecciones subclínicas o desafíos inmunológicos, ya que los desafíos inmunológicos pueden alterar de forma directa el consumo voluntario de alimento, la conversión alimenticia, el crecimiento y la salud del animal. Respecto a los mecanismos de acción de las levaduras y de PCL de *S. cerevisiae* reportados en animales monogástricos, sus efectos podrían agruparse en tres distintos niveles.^{62,84,85}

- 1) Exclusión de patógenos y micotoxinas.
- 2) Estimulación del desarrollo de la mucosa digestiva.
- 3) Estimulación de sistema inmune.

1.10.8.1. Exclusión de patógenos y micotoxinas.

De acuerdo a Buts en el 2005⁸⁶, la levadura *Saccharomyces* puede generar efectos farmacodinámicos semejantes a los efectos fisiológicos observados para la flora intestinal normalmente equilibrada. Diversos estudios realizados en roedores alimentados con *Saccharomyces boulardii* han descrito una mayor supervivencia de estos animales posterior al desafío con bacterias patógenas, por ejemplo: mortalidad a causa de colitis provocada por *Clostridium difficile* en hámsteres; en ratones inoculados oralmente con *Clostridium difficile* o por inoculación directa de sus toxinas A y B. En el caso de la infección intestinal causada por *Clostridium difficile*, el efecto protector que podría justificar la mayor supervivencia de los animales que consumieron células de levaduras, incluiría el siguiente mecanismo: en modelos de estudios realizados con asas intestinales de conejos infectados con *Clostridium difficile*, fue demostrado que *Saccharomyces boulardii* produjo una proteasa con un peso molecular de 54 kDa, que disminuyó las secreciones de líquidos y electrolitos de la mucosa digestiva.^{87,87}

Castagliuolo en 1996⁵⁹, confirmó que la proteasa parcialmente purificada podía proteolizar directamente y específicamente la toxina A y destruir parcialmente el área del receptor en la membrana intestinal de la toxina, inhibiendo la fijación a los receptores de las toxinas A y B. En ratones inoculados oralmente con un toxoide, la administración de *Saccharomyces boulardii* permitió amplificar significativamente la respuesta inmune específica medida a través de la concentración sérica de la antitoxina A de anticuerpos secretores IgA e IgM.^{59,88,89}

Recientemente, estudios in vitro mostraron que *Saccharomyces boulardii* tiene la capacidad de inhibir la adherencia de *Clostridium difficile* a las células intestinales. Otros estudios con el uso de asas intestinales ligadas a nivel del duodeno de ratones, sugirieron que la administración de *Saccharomyces boulardii* reducía significativamente la hipersecreción de sales y líquidos provocada por la inoculación previa con la toxina del cólera. Similares efectos de inhibición fueron confirmados en modelos in vitro con el uso de células epiteliales del intestino de ratas. La administración de *Saccharomyces boulardii* a ratones gnotogénicos inoculados oralmente con una suspensión de *Shigella flexneri* o *Salmonella typhimurium*, mostraron efectos protectores que

representaron una menor mortalidad por *Shigella flexneri* y menor severidad de lesiones intestinales a causa de *Salmonella typhimurium*.^{90, 91, 92}

1.10.8.2. Exclusión de bacterias fimbria-1 específicas.

El proceso de colonización del tracto digestivo por microorganismos potencialmente patógenos, se lleva a cabo gracias al empleo de un grupo de proteínas y glicoproteínas bacterianas de superficie denominadas lectinas. Las lectinas son glicoproteínas que se caracterizan por tener la capacidad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos de forma libre o que constituyen estructuras más complejas, de tal forma, microorganismos como *Salmonella*, *Escherichia coli* o *Vibrio cholerae* que presentan fimbrias tipo-1, utilizan lectinas con afinidad por la manosa con el fin de unirse a ciertos carbohidratos de superficie localizados en las células epiteliales de la mucosa digestiva, para fijarse y colonizar la mucosa digestiva.⁹³

Estudios realizados con la utilización de manano-oligosacáridos o MOS derivados de PCL, y de células de *Saccharomyces* suministrados por vía digestiva a aves, muestran ser una buena alternativa para reducir la prevalencia de colonización del ciego de pollos por cepas de *Salmonella enteritidis*.^{93, 94}

Parte de los mecanismos de acción que han sido descritos para justificar el efecto de exclusión de patógenos que pueden ejercer las levaduras y las PCL sobre bacterias patógenas, parten del estudio de la sensibilidad de las fracciones D-manosa y metil- α -D-manosido para unirse a las lectinas afines a receptores presentes en cierto tipo de bacterias que presentan fimbrias tipo-1. En estos estudios, se ha reportado que las fracciones D-manosa y metil- α -D-manosido pueden ejercer un efecto de inhibición, mayor a un 90%, de la adherencia de *Salmonella typhimurium* a las células digestivas epiteliales de pollos de un día de edad. Posteriormente, estos estudios fueron validados en aves a los cuales se les suministró *Salmonella typhimurium* en el agua de bebida con y sin fracciones de D-manosa. Los resultados mostraron que la utilización de D-manosa redujo el porcentaje de pollos colonizados con *Salmonella typhimurium* de 78% a 28%, de 82% a 21% y de 93% a 43%, en tres experimentos respectivamente.^{95, 96, 97}

No obstante, debido al alto costo de las fracciones de D-manosa, su utilización en condiciones comerciales podría ser prohibitiva, incluso bajo periodos cortos de administración.

Respecto al empleo de la levadura de *Saccharomyces*, algunos estudios han descrito que pollos de engorda alimentados con *Saccharomyces boulardii* mostraron una mejora en su eficiencia productiva al ser desafiados con *Salmonella enteritidis*. Por otro lado, la suplementación en la dieta con *Saccharomyces boulardii* ha resultado en un menor porcentaje de colonización del ciego con *Salmonella enteritidis* en pollos de engorde sometidos a estrés por transporte. Con la utilización de PCL, Spring en el 2000⁹⁷, encontró una reducción en la colonización de *Salmonella* en el ciego de 89.8 a 55.7%. En una serie de estudios, Fernández en el 2000⁹⁸, observó que gallinas alimentadas con fracciones de MOS mostraban un incremento en las poblaciones de bacterias del ciego correspondientes a *Bifidobacterium spp* y *Lactobacillus spp*, y una disminución de Enterobacterias. Posteriormente, el contenido cecal de estas gallinas fue proporcionado a pollos de engorde como un producto de exclusión competitiva, observándose que aquellos pollos que consumieron el contenido cecal de aves suplementadas con MOS fueron menos susceptibles a ser colonizados con *S. enteritidis*.^{94, 95, 97, 98}

1.10.8.3. Secuestro de micotoxinas.

La estructura química de las PCL no solo exhibe un alto grado de antígenicidad debida a sus fracciones de β -glucanos y manosa. En estudios recientes in vitro, se ha sugerido que esta estructura tridimensional constituida principalmente por polisacáridos, es capaz de llevar a cabo reacciones de absorción para ciertas micotoxinas de tipo aflatoxina, zearalenona y ocratoxina.⁹⁹

Debido a que los hongos contaminan los cereales frecuentemente en la mayor parte de los países, la presencia de micotoxinas en materias primas y alimentos para animales también llega a ser frecuente. Algunos ejemplos de micotoxinas identificadas en materias primas y alimentos contaminados de forma natural empleados en avicultura son: aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenonas, toxina T-2, vomitotoxina y fumonisina.¹⁰⁰

En alimentación de aves, los resultados positivos encontrados en modelos *in vitro* para las PCL como absorbente de micotoxinas coinciden con los estudios *in vivo* en pollos de engorde, en los cuales las levaduras de *S. cerevisiae* y PCL fueron capaces de contrarrestar los efectos tóxicos de piensos contaminados con aflatoxinas suministrados a las aves. En otros estudios realizados con gallinas reproductoras de estirpe pesada, se observó una reducción en la productividad cuando las gallinas consumían piensos contaminados con aflatoxinas. Sin embargo, cuando se les incorporaban PCL a los piensos contaminados, las aves mostraban una recuperación parcial de los parámetros de productividad. En un estudio más reciente Zaghini en el 2005¹¹⁴, encontró que la suplementación de MOS a piensos contaminados con aflatoxinas, resultaba en una reducción en la concentración de metabolitos de aflatoxinas en el hígado de gallinas alimentadas con estos piensos contaminados.^{101, 102}

De manera general, los glucomanos adicionados al alimento de pollos de engorde a dosis de 0.5 a 1.0 kg por tonelada, mostraron ser capaces de contrarrestar los efectos negativos de piensos contaminados con aflatoxinas sobre la productividad y órganos como el riñón, hígado, bolsa cloacal, timo y bazo de los pollos. En estudios, se encontraron que los glucomanos adicionados en el alimento contaminado con aflatoxinas y proporcionado a las aves, eran capaces de reducir la absorción de las aflatoxinas a escala digestiva. En el caso de gallinas de postura, los glucomanos adicionados a 2 kg por tonelada de alimento mostraron resultados favorables sobre el control de los efectos adversos de piensos contaminados con micotoxinas como zearalenona y deoxivalenol.^{103, 104, 105}

En la tabla 10 se presentan de forma resumida una serie de estudios realizados en aves, en los cuales se evaluó la capacidad de aditivos provenientes de PCL descritos como glucomanos esterificados para contrarrestar los efectos adversos de diferentes micotoxinas suministradas a las aves.

1.10.8.4. Efecto trófico sobre la mucosa digestiva.

Los efectos que pueden ejercer las levaduras de *Saccharomyces* sobre la fisiología digestiva de los animales continúan siendo ampliamente desconocidos aunque estudios realizados en humanos y ratas con levaduras de *S. boulardii* suministradas

oralmente, sugieren que la levadura podría ejercer un efecto trófico a escala de la mucosa digestiva. Se encontró un incremento significativo en la actividad específica de enzimas (sucrasa, lactasa, maltasa) de la membrana en el borde de cepillo de las células epiteliales del intestino delgado sin llegar a modificarse la morfología de la mucosa. En el caso de las ratas, un estudio posterior sugirió que el efecto trófico sobre la mucosa digestiva podría ser mediado por el estímulo en la producción y liberación de espermina y espermidina por parte de la levadura.^{106, 107}

En pollos de engorda, la suplementación en el alimento con levaduras de *S. boulardii* a una dosis de 0.2 Kg/Ton, resultó en una disminución del número de células caliciformes, menor profundidad en las criptas y no causó efectos en la altura y amplitud de las vellosidades del íleon. En estudios recientes, se observó que el empleo de levaduras de *S. cerevisiae* a una dosis de 5 Kg/Ton de alimento o 25 veces mayor al estudio de Bradley en 1994¹⁰⁹, provocaba un incremento en la altura de las vellosidades y un mayor valor para la proporción altura/profundidad de las criptas de las vellosidades del íleon. Ambos trabajos sugieren que al igual que en humanos y ratas, las levaduras de *Saccharomyces* podrían ejercer un efecto trófico en la mucosa digestiva del pollo de engorde.^{108, 109, 110}

Los resultados sobre el empleo de fracciones de PCL en dietas para pollos pueden sugerir también un efecto trófico a escala de digestiva. Santinen 2001¹¹¹ incorporó PCL de *Saccharomyces cerevisiae* a 2 Kg/Ton de alimento de pollos de engorda, y encontraron una mayor altura de las vellosidades en las tres secciones del intestino delgado, observándose criptas menos profundas solo en el caso del yeyuno. Posteriormente este efecto fue corroborado por Zhang en 2005¹¹⁰, quien adicionó a la dieta de pollos de engorda 3 Kg de PCL por tonelada, encontrando una mayor altura de vellosidades y mayor valor en la proporción de la altura de la vellosidad/profundidad de las criptas de la mucosa ileal. En los trabajos de Santin y Zhang, los autores sugirieron que las PCL causaron un efecto positivo en el desarrollo de la mucosa digestiva del pollo, ya que los grupos alimentados con PCL mostraron un mayor crecimiento en relación a los grupos controles sin PCL.^{112, 116}

En otro estudio Iji en 2001¹¹² evaluó la inclusión de MOS a 1, 3 y 5 Kg por tonelada de alimento sobre la morfología y actividad enzimática de la mucosa digestiva

de pollos de engorda. Los resultados a los 21 días de edad de las aves, mostraron que con la dosis de 5 Kg de MOS se obtuvieron mayores alturas de vellosidades en yeyuno y con 3 y 5 Kg se incrementó la actividad enzimática de la membrana en bordede cepillo de las células del epiteliales y el transporte de aminoácidos a nivel la mucosadel yeyuno.¹¹⁸

Tabla 10. Efectos de la incorporación de glucomananos de PCL a dietas para pollos de engorda contaminadas de forma experimental con diversas micotoxinas.

113,114, 115, 116, 117

Dosis Kg/Ton	Efectos	Autor
1.0	Recuperación de parámetros productivos y de la función hepática y renal por la intoxicación con aflatoxinas (300 ppb), OA (2000 ppb) y T-2 (3000 ppb)	Veldman,2004
0.5	Recuperación de parámetros productivos y de los pesos relativos del hígado y molleja, por la intoxicación con ocratoxinas (8.4 ppb), zearalenona (54 ppb) y T- 2 (32 ppb)	Zaghini et al, 2005
1.0	Mayor recuperación de aflatoxina en el contenido digestivo (menor absorción digestiva)	Yianninkouris, et al, 2003
1.0	Recuperación de parámetros productivos y de los pesos relativos del hígado, riñón y timo, por la intoxicación con aflatoxina (2000 ppb) y T-2 (1000 ppb)	Aravind, et al, 2003
0.5	Disminución en la severidad de las lesiones observadas en hígado, riñón, bolsa de Fabricio, timo y bazo por la intoxicación con aflatoxina (2000 ppb)	Girish y Devegowda, 2004

1.10.8.5. Estimulación del sistema inmune.

En 1900 el investigador Von Dungern observó que levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en la industria de panadería, interactuaban con las proteínas del complemento del sistema inmunitario. Posteriormente, en 1941 se encontró que el

componente activo en la levadura involucrado en esta reacción correspondía a la fracción insoluble de (1-3/1-6) β -glucanos, polisacárido presente en mayor concentración en la PCL, denominándolo como “Zimozan”. La administración de (1-3/1-6) β -glucanos y depolímeros derivados de PCL de forma experimental a animales mamíferos resulta en remarcables efectos en el sistema inmunitario, que incluyen estimulación de las células del sistema retículo endotelial, incremento de la resistencia a infecciones y regresión de tumores.¹¹⁸

El mecanismo de acción propuesto es la estimulación de la inmunidad innata, específicamente a nivel de monocitos y macrófagos, células que presentan receptores para β -glucanos, y que al ser estimulados inducen la producción de TNF- α , IL-1, factor activador de plaquetas y metabolismo de los eicosanoides, conduciendo a un estado de alerta inmunológico. En humanos, el consumo de levaduras resultó en una serie de cambios a escala celular y humoral en los perfiles sanguíneos. Esta serie de cambios incluyeron incrementos en las células de tipo eritrocitos, leucocitos, células plimorfonucleares, neutrófilos y componentes del sistema de proteínas del complemento (C3, C5, C3d).^{119, 120, 121, 122}

En ratas que consumieron *Saccharomyces boulardii*, se observó un incremento significativo en las concentraciones de IgA secretora en el líquido intestinal y en las concentraciones de la porción secretora de las células crípticas de la mucosa intestinal. Este incremento en la producción de IgA totales y anti-*Saccharomyces boulardii* fue corroborado en estudios posteriores realizados por Rodrigues en 2000¹²³ con ratones gnotobióticos.^{87, 123}

En aves, los estudios sobre la respuesta inmunitaria con el empleo de la PCL como estructura completa, o con fracciones de β -glucanos son pocos, Santin en 2001¹¹¹ incluyó PCL a 2 Kg/Ton de alimento a dietas contaminadas con aflatoxinas (1000 ppb), proporcionadas a pollos de engorda vacunados contra el virus de la enfermedad de Newcastle. Las determinaciones de anticuerpos en días posteriores a la vacunación no mostraron una mayor respuesta de anticuerpos vacúnales en las aves que consumieron PCL, no obstante este grupo de aves sí mostró una mejor respuesta inmunológica en un posterior desafío con un virus cepa velogénica de la enfermedad de Newcastle.¹¹¹

Stanley en 2005¹²⁴ encontró que el empleo de PCL a 1 Kg/Ton en el alimento de pollos de engorda representó beneficios en términos de un mejor comportamiento productivo en aves mantenidas en camas recicladas, que en un primer estudio pertenecieron a aves inoculados con coccidias de tipo *Eimeria maxima* y *E. tenella*, efecto que represento un desafío inmunitario.¹²⁴

Con el empleo de β -glucanos purificados, Acevedo en 2001¹²⁵ vacuno contra la enfermedad de Newcastle y suministraron por vía oral (1,3) β -glucanos a pollos de engorda. En este caso la suplementación de 5 y 10 mg/Kg de alimento resultó en una mayor producción de anticuerpos contra Newcastle. En otro estudio, los mismos autores encontraron que pollos a los cuales se les suministró de forma intraperitoneal (1,3) β -glucanos a dosis de 5 y 10 mg/Kg, mostraron una estimulación en la respuesta T inespecífica.¹²⁵

Un estudio más reciente llevado a cabo en pollos de engorda por Guo en 2003¹²⁶ demuestra la capacidad inmunomoduladora de fracciones de β -glucanos provenientes de PCL e incorporadas en la dieta. En estos trabajos, los β -glucanos adicionados a 20 y 40 mg/Kg de alimento, indujeron mayor proliferación de macrófagos, mayor producción de nitritos y de interleucina-1, además de mayores pesos relativos de la bolsa cloacal, timo y bazo.¹²⁶

Con utilización de MOS, Savage en 1996¹²⁷, alimento pavos machos durante 53 días con 0.11% de MOS en la dieta, al final del periodo experimental obtuvieron muestras de sangre y bilis. Estas muestras fueron analizadas por técnicas de inmunodifusión radial y por inmuno-electroforesis, a pesar de que las pruebas de inmuno-electroforesis no mostraron diferencias en el perfil de anticuerpos, en el caso de las pruebas de inmunodifusión radial se observó un incremento de las inmunoglobulinas de tipo IgG e IgA en sangre y en bilis de los pavos que consumieron MOS.¹²⁷

En gallinas de postura, se evaluó el efecto de la suplementación de MOS en la dieta sobre la inmunidad humoral mediante la inoculación de una suspensión de albúmina sérica bovina (ASB) y de glóbulos rojos de borrego (GRB). Una semana post-inoculación de los antígenos, los resultados de este estudio mostraron que las gallinas suplementadas con MOS a 500 g/Kg de alimento, tuvieron títulos de anticuerpos

mayores de GRB, y en el caso de la ASB, sólo se obtuvieron diferencias numéricas en la 1ª y 2ª semana post-inoculación para las gallinas alimentadas con MOS. En otro estudio realizado en gallinas de postura de estirpe pesada, la incorporación de MOS en la dieta resultó en un incremento significativo de la respuesta de anticuerpos contra la vacuna de la infección de la bolsa cloacal en las madres y en la progenie.^{128, 129}

2. JUSTIFICACIÓN.

Debido a que el principal ingrediente en los alimentos balanceados son los granos y que estos, con frecuencia se encuentran contaminados con aflatoxinas y este es un problema que afecta el desempeño productivo de las aves de producción y disminuye su respuesta inmune es necesario implementar medidas de prevención y/o control como son las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* para disminuir los efectos causados por las toxinas.

3. HIPOTESIS.

El uso de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL 0.5 Kg/Ton) disminuirá los efectos negativos sobre los parámetros productivos, inmunidad, perfil bioquímico y pesos relativos de órganos blancos provocadas por la ingesta de aflatoxinas B₁ y B₂ (AFB 200 µg/Kg) en el pollo de engorda.

4. OBJETIVOS.

4.1.Objetivo general.

Evaluar la eficiencia de la PCL adicionada al alimento sobre los parámetros productivos, perfil bioquímico, respuesta inmune y morfología celular en pollos de engorda Ross 308 que consumen alimento contaminado con AFB.

4.2.Objetivos particulares.

- Evaluar el desempeño productivo midiendo el peso vivo final, consumo de alimento e índice de conversión alimenticia en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.
- Evaluar el peso relativo de hígado, riñón, bazo y bolsa cloacal en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.
- Evaluar la inmunidad, midiendo la respuesta a la vacunación contra la enfermedad de Newcastle por medio de una prueba de inhibición de la hemoaglutinación en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.
- Evaluar el efecto sobre proteínas plasmáticas y albúmina, mediante pruebas de bioquímica sanguínea en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.
- Evaluar el efecto sobre los niveles de enzimas séricas (ALT, AST y FAS), mediante pruebas de bioquímica sanguínea en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se emplearon 120 pollitos línea Ross 308 de 1 día de edad, sin sexar, se distribuyeron completamente al azar en 4 tratamientos con 3 repeticiones y 10 aves por repetición, el experimento tuvo una duración de 49 días.

Tabla 11. Distribución de tratamientos.

Tratamiento	Contenido de PCL y/o AFB
PCL	0,5 Kg/Ton
AFB 200	200µg/Kg
Mezcla	PCL (0.5 Kg/Ton) + AFB (200 µg/Kg)
Control	PCL (0 Kg/Ton) + AFB (0 µg/Kg)

Tabla 12. Actividades durante el experimento.

Día	Actividad
1	Recepción de los pollos y división por tratamientos.
7	Pesaje de los animales y del alimento, vacunación contra la enfermedad de Newcastle.
14	Pesaje de los animales y del alimento.
21	Pesaje de los animales y del alimento, revacunación contra la enfermedad de Newcastle.
28	Pesaje de los animales y del alimento, muestreo de sangre, sacrificio para realizar necropsias.
35	Pesaje de los animales y del alimento.
42	Pesaje de los animales y del alimento.
49	Pesaje de los animales y del alimento, muestreo de sangre, sacrificio para realizar necropsias.

Desde el día 1 hasta el 49, los animales disponían de agua y alimento *ad libitum*.

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1. Obtención de aflatoxinas.

La obtención de las aflatoxinas se llevó a cabo en las instalaciones del CAT (Centro de Asimilación Tecnológica) Campo 3, UNAM.

- Se utilizó maíz amarillo, el cual se sometió a un proceso de limpieza manual con la finalidad de quitar los granos que pudieran estar rotos, sucios o pigmentados, ya que estas características pueden indicar que esos granos tienen una contaminación bacteriana o fúngica; en seguida se evaluó la presencia de aflatoxinas totales por medio de columnas de inmunoafinidad de la marca VICAM-AFLATEST®.¹³⁰
- Se inocularon 32 Kg de maíz con una cepa de *Aspergillus flavus* obtenida de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, identificada con el número de cepa 28 productora de aflatoxina B₁ y aflatoxina B₂. Se preparó una suspensión de esporas a una concentración de 1,556,000/10 ml y se aforó a 100 ml.
- Se analizó la humedad del maíz con un determinador de humedad Motomco® 919, obteniéndose un resultado de 12% de humedad. La humedad se ajustó a 19% para favorecer el crecimiento del hongo. Una vez determinada la humedad se hizo una solución con esporas para cada 1.5 Kg de maíz.¹³¹
- El tiempo de incubación fue de 39 días ajustado a una temperatura promedio de 27° C y humedad relativa del 19%.¹³¹
- Se llegó a un contenido final de 25,000 de AFB de µg/Kg de alimento, en un total de 32 Kg de maíz, una vez alcanzado el contenido se esterilizó el alimento para inactivar al hongo y las esporas viables y con esto preservar solo la toxina.

131

- Se realizó determinación de AFB totales para conocer los contenidos homogéneos del alimento, para la realización de la evaluación de los contenidos de aflatoxinas, se utilizó la marca VICAM-AFLATEST®.¹³¹
- Se utilizó una mezcladora mecánica con cintas de acero (modelo Mix 20, con capacidad de 20 Kg) para mezclar 200 µg de aflatoxinas/Kg de alimento.

6.2.Paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se utilizó el producto Safmannan®, que se utiliza como suplemento nutricional prebiótico para animales. Es una fuente purificada de manano-oligosacaridos y β-glucanos obtenidos de una levadura primaria inactivada para su uso en alimentos para animales, su constitución es:¹³¹

Tabla 13. Composición de la PCL de Safmannan®.¹³²

Compuesto	Porcentaje
β-glucanos	24% min
Mananos	22% min
Proteínas	14% min
Materia seca	97% min

Se utilizó una mezcladora mecánica con cintas de acero (modelo Mix 20, con capacidad de 20 Kg) para mezclar 0.5 Kg de pared celular/Ton de alimento.

6.3.Caseta avícola.

Se utilizó la caseta de producción avícola ubicada en el Centro de Enseñanza Agropecuaria (CEA) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4.

Se realizó limpieza minuciosa de la caseta incluyendo piso, paredes, techo y cortinas, posterior a la limpieza se realizó una desinfección por aspersión con cuaternarios de amonio.

Una vez desinfectado el lugar se instalaron:

- Cortinas de poliuretano transparente en disposición de túnel para mantener la temperatura interna y manejar la ventilación.
- 12 corraletas plásticas marca Sefhnos[®] para lotificar a las aves, cada corraleta se ajustó a un área de 1.20 m².
- Viruta de madera que sirvió como cama para cada uno de los lotes.
- 12 bebederos marca Sefhnos[®] con una capacidad de un galón durante las 2 primeras semanas del experimento.
- 12 bebederos de campana automáticos marca Sefhnos[®], que se utilizaron a partir de la semana 3 del experimento.
- 12 chickfeeder marca Sefhnos[®] durante las 2 primeras semanas del experimento.
- 12 comederos tipo tolva marca Sefhnos[®] con capacidad de 5 Kg a partir de la semana 3 del experimento.
- 3 criadoras tipo campana de gas marca PSI[®] 10 kw LP modelo 134.
- Tapetes sanitarios en cada entrada de la caseta, los tapetes contenían cuaternarios de amonio al 20%.
- Se utilizó alimento balanceado marca Nutrición Técnica Animal[©], para pollo de engorda etapas de iniciación y finalización, sin ningún tipo de aditivo alimenticio y con un análisis nutricional como se muestra en la tabla 14:

Tabla 14. Composición de la dieta utilizada.

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

6.4. Parámetros productivos.

Se realizó el manejo zootécnico utilizado en las producciones comerciales de pollo de engorda en México a 49 días de producción; el cual consiste en suministrar alimento y agua al inicio de la jornada, realizar rondines cada determinado tiempo para checar si existen anomalías en comederos, bebederos, ventilación y retirar mortalidad si existe.

Se identificaron a las aves con anillos plásticos en las patas, hasta las primeras 3 semanas y posteriormente se pigmentaron alas con pigmento no tóxico base aceite, para diferenciar a cada una de las aves. Para la lectura y registro de las variables productivas como son peso corporal individual semanal, consumo de alimento semanal e Índice de conversión alimenticia se utilizó una báscula digital Kg/Kg Torrey® PCR comercial, donde se realizó la toma de estos datos semanales por cada corraleta hasta el final del experimento.

Para conocer el consumo de alimento semanal se realizó el cálculo diferencial entre el alimento ofrecido durante la semana y el alimento rechazado al final de esa semana.

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

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

6.5. Vacunación.

Las aves se vacunaron contra el virus de la Enfermedad de Newcastle utilizando una vacuna de virus vivo cepa La Sota, liofilizada (Laboratorios Maver®), esta se administró por vía ocular según las recomendaciones del fabricante a los días 7 y 21 del experimento.¹³²

- Composición. La vacuna de Newcastle virus vivo cepa La Sota liofilizada es desarrollada en embrión de pollo SPF, bajo las más estrictas normas de control

decalidad y técnicas más modernas de fabricación que maximizan y garantizan la integridad de los antígenos.¹³³

- Uso en: Aves.
- Descripción: sólida, segura y confiable: la vacuna contra la enfermedad de Newcastle cepa La Sota de Maver[®] contiene títulos los cuales se reflejan en gran protección de las aves contra esta enfermedad (no menos de 10⁹). Es una vacuna que no revierte a estados patógenos por el tipo de cepa que se utiliza, sin embargo, confiere protección sólida contra la enfermedad de Newcastle incluso en zonas de alta incidencia o recurrencia.
- Indicaciones: Está indicada para la prevención y control de la enfermedad de Newcastle en aves sanas a partir de la primera semana de edad. La vacuna de virus vivo de administración ocular, confiere protección a nivel traqueal, produce anticuerpos del tipo IgA secretor, protegiendo la vía de entrada natural del virus al organismo.
- Dosis y vía de administración: Instilación ocular; Una gota en el ojo por ave.
- Advertencias: Manténgase en refrigeración entre 2 a 7°C. Evite que el producto se congele. No se exponga a la luz solar. Una vez preparado el producto utilícelo en su totalidad a la brevedad.
- Presentaciones: Frascos con 25, 50, 100, 500 y 1,000 dosis de Vacuna virus vivo liofilizada contra la enfermedad de Newcastle (Paramixovirus) cepa La Sota.

6.6. Toma de sangre y obtención de suero.

Se tomaron muestras de sangre los días 28 y 49 por la técnica de punción directa a corazón, la sangre se utilizó para determinar proteínas totales y albúmina; el suero fue utilizado para la medición de enzimas séricas y determinación de títulos de anticuerpos a través de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.¹³³

6.6.0.1. Material para el muestreo de sangre y obtención de suero.

- 5 cajas de tubo Vacutainer Becton Dickinson[®] de tapón rojo convencional, con un volumen de 3 ml.
- 1 caja de jeringas hipodérmicas volumen 5 ml.

- 2 tubos de 100 pipetas capilares
- Tubos capilar translúcido con EDTA k2 tapón lila, Volumen 250-500 MCL.
- Micro centrifuga 50,000 rpm, Clay Adams AU1[®].
- 1 frasco de heparina sódica 25,000 UI.
- Gradillas.
- Mechero de bunsen.
- Refractómetro Atago[®] ATC-S/Mill-E.
- Viales de cristal para conservación de suero.
- Kit Albumina AA 6 x 120 ml de Wiener lab[®].
- Kit Proteínas Totales AA 10 x 20 ml de Wiener lab[®].

6.6.0.2. Método para el muestreo de sangre y obtención de suero. ¹³⁴

El muestreo de sangre se realizó por la técnica de punción cardiaca; En la primer toma de muestra se obtuvieron 3 ml de sangre y este volumen se vertió en 2 diferentes tubos de vacutainer; uno de ellos con heparina y el otro sin heparina, el tubo con heparina se mantuvo con movimientos suaves para mezclar la heparina con la sangre y evitar así el proceso de coagulación, el siguiente tubo se colocó en una gradilla con un ángulo de 45 grados y a temperatura ambiente para que se formara el coagulo, posteriormente se colocaron estos tubos en la centrifuga a 15,000 g para que el coagulo fuera más compacto y así obtener suero en mayor cantidad.

Para la segunda toma de muestras el volumen final fue 5 ml y de esta cantidad se tomaron 2.5 ml para obtención de plasma y 2.5 ml para obtención de suero.

Ya obtenidas las muestras se colocaron en viales limpios y estériles, para su conservación se refrigeraron las muestras de sangre completa a 4°C y el suero se llevó a congelación hasta -3°C.¹³⁴

6.6.1. Determinación de proteínas totales y albumina.

La alteración de la concentración de proteínas plasmáticas depende de varios factores; el estado nutricional, el estado de salud y la hidratación influyen de manera

importante. Los cambios en la concentración de proteínas no indican la presentación de una enfermedad específica, sino un estado de desbalance entre la síntesis proteica y el catabolismo. La disminución drástica se puede observar en enfermedades hepáticas y renales. Aunque no todas las alteraciones de las proteínas séricas son de origen hepático, la combinación de una baja de la albumina y/o un aumento de las inmunoglobulinas es bastante sugestivo de enfermedad hepática.¹³⁵

Para la determinación de proteínas totales y albumina se utilizaron las técnicas descritas por el laboratorio Wiener-Lab® (Figura 7 y 8).¹⁷⁰

Figura 7. Método colorimétrico para la determinación de proteínas totales.¹⁷⁰

PROCEDIMIENTO			
En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:			
	B	S	D
Calibrador / Suero Patrón	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo A	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml

Mezclar con varilla. Incubar durante 15 minutos a 37°C. Leer en espectrofotómetro a 540 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (520-560 nm) llevando a cero con el Blanco de Reactivo.

Figura 8. Método colorimétrico para la determinación de albumina.¹³⁶

PROCEDIMIENTO			
En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:			
	B	S	D
Calibrador / Suero Patrón	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo A	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Mezclar con varilla. Mantener los tubos entre 15 y 28°C durante 10 minutos. Leer en espectrofotómetro a 625 nm o en fotocolorímetro con filtro rojo (620-650 nm) llevando a cero con el Blanco de Reactivo.

6.6.2.Determinación de títulos de anticuerpos.

Se realizó separación y conservación de suero para realizar una prueba de titulación de anticuerpos vacúnales contra la Enfermedad de Newcastle, utilizando la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.¹³⁵

6.6.2.1. Material para la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

- Placas fondo en U.
- Solución PBS.
- Pipetas.
- Platina de calor.
- Gradillas.
- Tubos de ensaye volumen 5 ml.
- Matraz aforado 10 ml.
- Matraz aforado 50 ml.
- Matraz aforado 100 ml.
- Pipetas 1 mm.
- Pipetas 5 mm.
- Pipetas 10 mm.
- Bullas para pipeta.
- 1 Cronometro.
- Multipipetas INTECH[®] 0.2 -50 µl.
- Micropipeta 50-100 µl.
- Vacuna virus vivo liofilizado contra la enfermedad de Newcastle cepa La sota, Laboratorio Maver[®].

6.6.2.2. Método para la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.¹³⁶

- Se coloca una gota de 0,025 ml de PBS en cada cubeta de la placa, exceptuando el primer orificio de la primera columna.

- Se colocan 0,025 ml de suero tratado y diluido 1/5 en cada cubeta de la primera columna, utilizando una pipeta para cada suero. Se agrega una gota de 0,025 ml a la segunda y última cubeta.
- Proceder a diluir dobles seriadas con las pipetas de 0,025 ml, desde la segunda hasta la penúltima cubeta.
- Agregar la suspensión de virus con pipeta de 0,025 ml. una gota de 0,025 ml por cubeta, excepto en la última.
- Dejar una hora a temperatura ambiente para que se de la unión virus-anticuerpo.
- Agregar una gota de 0,05 ml. de la suspensión de glóbulos rojos 1% a cada orificio, incluyendo los controles de suero.
- Mezclar suavemente y dejar a 28 °C durante 30 min.

6.6.2.3 Interpretación para la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

Se tomará como punto final de la actividad del suero, la máxima dilución en la que el fenómeno de hemoaglutinación ha sido inhibido. El resultado se expresa en Unidades Inhibidoras de la Hemoaglutinación (UIHA). La dilución de punto final de la actividad del suero se multiplica por las unidades hemoaglutinantes del virus utilizado (8 UHA) y esto nos dará el número de dosis inhibitorias hemoaglutinantes del suero por unidad de volumen.¹³⁸

6.6.3. Perfil bioquímico.

Un apartado importante de la bioquímica sanguínea es la determinación de diversos parámetros bioquímicos, es decir la concentración de varias sustancias químicas transportadas por la sangre en algún momento dado.

6.6.3.1 Material para el perfil bioquímico.

- Espectrofotómetro Varuan[®] Modelo Cary 100.
- Platina de calor.
- Gradillas
- Tubos de ensaye volumen 5 ml.

- Matraz aforado 10 ml.
- Matraz aforado 50 ml.
- Matraz aforado 100 ml.
- Pipetas 1 mm.
- Pipetas 5 mm.
- Pipetas 10 mm.
- Bullas para pipetas.
- Cronometro.
- Multipipetas INTECH[®] 0.2 -50 ul.
- Micropipeta 50-100 ul.
- Kit GPT (ALT) UV AA Liquida 200ml: 4x40ml A + 1x40 ml B, Wiener-lab[®].
- Kit GOT (AST) UV AA Liquida 200ml: 4x40ml A + 1x40 ml B, Wiener-lab[®].
- Kit Fosfatasa Alcalina optimizada, 200 determinaciones, Wiener-lab[®].

6.6.3.2.Determinación de enzimas séricas.

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

6.6.3.2.1 AlaninaAminotranferasa (ALT).

Los hepatocitos producen la enzima ALT. Concentraciones altas de ALT indica muerte celular o una inflamación del hígado. A pesar de esto la ALT no siempre es buen indicador de la funcionalidad del hígado. Las concentraciones de ALT pueden permanecer bajas incluso si el hígado está inflamado o si se está formando tejido cicatricial.¹³⁷

6.6.3.2.2AspartatoAminotransferasa (AST).

Así como la ALT, la AST es una enzima producida por las hepatocitos y además los músculos también producen AST y se pueden encontrar niveles altos por procesos

diferentes a la enfermedad hepática. Muy a menudo la AST se encuentra en niveles altos durante un infarto al miocardio. Las concentraciones de AST pueden ser normales, y aun así puede haber daño hepático.¹³⁷

6.6.3.2.3 Fosfatasa Alcalina (FAS).

La FAS es una enzima que se encuentra principalmente en hígado (canalículos biliares), riñones y huesos. Esta enzima se mide para determinar si una enfermedad está ubicada en las vías biliares o bien en el hígado. Cuando hay concentraciones altas de esta enzima y las concentraciones de ALT y AST son normales, puede existir un problema en las vías biliares. Algunos trastornos óseos también pueden causar concentraciones altas de esta enzima.¹³⁷

Para la determinación de las enzimas ALT, AST y FAS, se utilizaron las técnicas descritas por el laboratorio Wiener-Lab[®] (Figura 9, 10 y 11).^{138, 139, 140.}

Figura 9. Método UV optimizado para la determinación de Alanina Aminotransferasa (ALT) en suero.¹³⁸

PROCEDIMIENTO	
A) 30 ó 37°C	
I- TECNICA CON REACTIVO UNICO	
En una cubeta mantenida a 30-37°C, colocar:	
Reactivo único	1,0 ml
Preincubar unos minutos. Luego agregar:	
Muestra	100 ul
Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Esperar 90 segundos y leer la absorbancia inicial (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO) y luego a los 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Determinar la diferencia promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.	

Figura 10. Método UV optimizado para la determinación de AspartatoAminotransferasa (AST) en suero.¹³⁹

PROCEDIMIENTO	
A) 30 ó 37°C	
I- TECNICA CON REACTIVO UNICO	
En una cubeta mantenida a 30-37°C, colocar:	
Reactivo único	1,0 ml
Preincubar unos minutos. Luego agregar:	
Muestra	100 ul
Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Esperar 90 segundos y leer la absorbancia inicial (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO) y luego a los 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Determinar la diferencia promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.	

Figura 11. Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (FAS) en suero.¹⁴⁰

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

6.7. Necropsias y obtención de órganos.

Se realizó la necropsia de 2 aves de cada tratamiento los días 28 y 49 para realizar la toma de muestras hígado, riñón, bolsa cloacal y bazo, igualmente se examinaron a las aves que murieron a lo largo del experimento.

6.7.1. Material para necropsias y obtención de órganos.

- Cuchillos.
- Pinzas de disección.
- Pinzas Kelly.
- Tijeras de Mayo.
- Bolsas Ziploc[®].
- Solución de formalina amortiguada al 10%.
- Balanza analítica g/g marca Omrom[®] wbs-05 con una capacidad del 0 a 5000 g.

6.7.2. Método para necropsias y obtención de órganos.

La técnica de la necropsia se realizó conforme al Manual de Necropsias de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán¹⁴¹, una vez realizada la extracción de órganos sistemática y ordenadamente se procedió a realizar el pesaje de los órganos extraídos para cada ave, esto se hizo para valorar un índice morfométrico para poder así ponderar tamaño de ave y su relación con el tamaño de los órganos.

Una vez realizado el pesaje de los órganos, se tomaron muestras de estos y se infundieron en formalina al 10% para su fijación y posterior procedimiento histológico, con la finalidad de encontrar lesiones sugestivas por toxicidad por aflatoxinas y la interacción con la PCL.¹⁴³

7. ANALISIS ESTADISTICO.

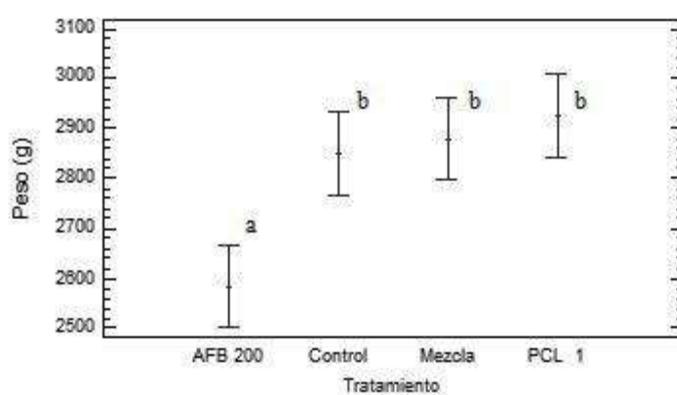
Las variables productivas, hematológicas e inmunológicas se analizaron conforme a un diseño completamente al azar, realizando la comparación de medias a través de la prueba LDS (LeastSignificantDifference) con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

El Método de la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher, sustenta que el riesgo global, puede ser considerablemente aumentado usando este método. Específicamente en la medida que aumenta, el error tipo I, del experimento entre el número de experimentos en el cual un error de tipo I es hecho y el número total de experimentos se torna grande. El procedimiento LSD es sencillo de utilizar; se puede aplicar tanto en modelos equilibrados como no-equilibrados. Además proporciona también intervalos de confianza para diferencias de medias.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cuadro 1 y Grafica 1. Peso acumulado final (g), mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.

Tratamiento	Peso acumulado final Media \pm EE (g)
PCL	2925.00 \pm 14.43 ^b
AFB 200	2584.00 \pm 63.72 ^a
Mezcla AFB + PCL	2880.33 \pm 77.34 ^b
Control	2850.00 \pm 15.01 ^b



PCL= Paredcelular de *Saccharomyces cerevisiae* 0.5 Kg/Ton, AFB= Aflatoxina 200= 200 μ g/Kg, \pm EE= error estándar, Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

En el cuadro 1 se puede observar lo siguiente:

- Los tratamientos en los que se administró PCL en su dieta obtuvieron las medias más altas, sin diferencia estadística entre estos tratamiento y el grupo control, pero si se compara con el tratamiento AFB 200, si se presentó una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).
- El tratamiento AFB 200, obtuvo la media más baja del experimento y una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en comparación con los demás tratamientos. Este tratamiento obtuvo los pesos más bajos de todo el experimento, lo cual puede sugerir que las aflatoxinas ejercieron efectivamente sus efectos negativos.

Discusión:

Los beneficios obtenidos en los parámetros de producción del pollo de engorde a partir de las PCL, han sido demostrados por autores como Zhang en 2005¹¹⁰ y Santin en 2003¹⁰³, el efecto observado se dio en el peso corporal y la conversión alimenticia. Arce en 2005¹⁴², realizó dos experimentos con pollos de engorde adicionando PCL a dietas elaboradas con sorgo y soja a diferentes dosis (250, 500, 1000 y 1500 ppm). Los resultados a los 49 días mostraron que la utilización de PCL a 500 ppm produjo efectos similares a los resultados obtenidos en este trabajo, la utilización en la dieta de PCL a 500 ppm, representó beneficios de +3.6% y +2.6% en el peso final.

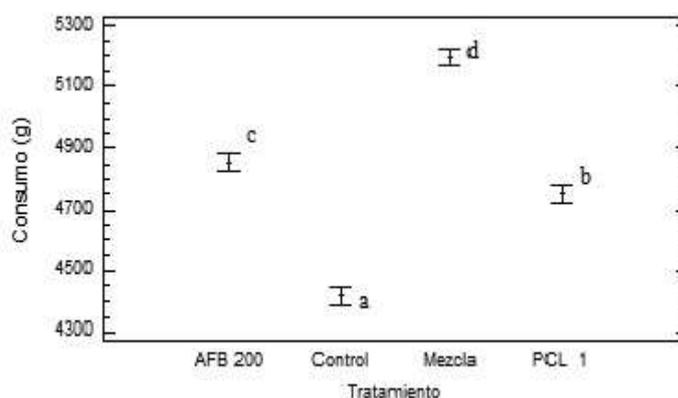
La utilización de las PCL como aditivo en el alimento del pollo de engorda en periodos comerciales de 49 días, muestra un aumento de los parámetros productivos como el peso final, debido a que son considerados como promotores del crecimiento de las vellosidades intestinales aumentando así la superficie de contacto en el intestino con el alimento, favoreciendo la digestibilidad de los nutrientes contenidos en el alimento.^{117, 118}

En este experimento se encontró que el uso de las PCL en los pollos que consumieron alimento contaminado con AFB resultó eficaz para reducir los efectos negativos de las AFB sobre el peso final de los animales, coincidiendo con lo dicho por la autora Eshak en 2010.¹⁴³

En este experimento se encontró que el tratamiento AFB 200, mostró los pesos más bajos de todo el experimento, demostrando así los efectos tóxicos negativos de las aflatoxinas, como lo menciona Rawal en el 2010.¹⁴⁴

Cuadro 2 y Grafica 2. Consumo de alimento acumulado (g) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.

Tratamiento	Consumo de alimento Media \pm EE (g)
PCL	4751.33 \pm 7.83 ^b
AFB 200	4852.33 \pm 13.67 ^c
Mezcla AFB + PCL	5193.33 \pm 27.43 ^d
Control	4417.33 \pm 16.91 ^a



PCL= Paredcelular de *Saccharomyces cerevisiae* 0.5 Kg/Ton, AFB= Aflatoxina 200= 200 μ g/Kg, \pm EE= error estándar, Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

- En el cuadro 2 se observa que el tratamiento Mezcla tuvo medias más altas en comparación con los otros tratamientos, mientras que los grupos Control y PCL obtuvieron los consumos más bajos del experimento.
- El tratamiento AFB 200 obtuvo un consumo “medio”, siendo más bajo al tratamiento Mezcla, pero mayor a los otros dos tratamientos.
- Cada tratamiento mostro una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en comparación con los demás tratamientos.

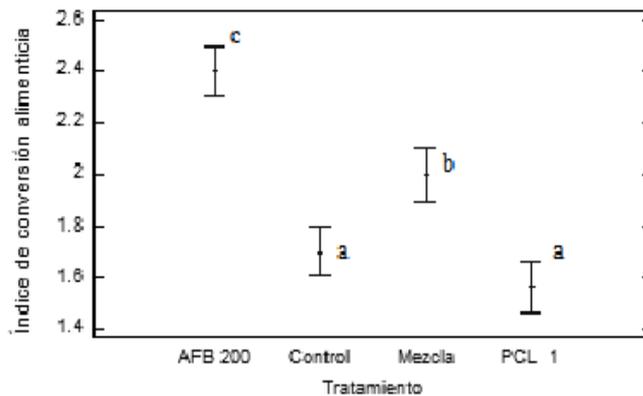
Discusión:

Autores como Arce en 2005¹⁴² y Keller en 2012¹⁴⁵ exponen que el consumo de dietas suplementadas con PCL y/o AFB no presentaban diferencia estadística significativa entre estos tratamientos ni entre los controles; Dalvi en 1984¹⁴⁶ menciona que en pollos de engorda que consumen aflatoxinas, el consumo de alimento desciende drásticamente en comparación con pollos con dietas sin aflatoxinas; Oguz en el 2000¹⁴⁷ reporta un aumento significativo del consumo de alimento en pollos que consumieron alimento contaminado con aflatoxina B₁, coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo, sin embargo la diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos bien pudo deberse a situaciones del microclima de la caseta avícola, es importante notar que aunque el tratamiento AFB 200 a pesar de haber obtenido un mayor consumo de alimento comparado con los tratamientos PCL y Control, obtuvo un menor peso final de los animales, lo que indica que los tratamientos PCL y Control tuvieron un mejor Índice de conversión alimenticia.

El tratamiento que mostro un mayor consumo de alimento fue el Mezcla, sin embargo este consumo no se vio reflejado en el peso final ya que este tratamiento tuvo pesos similares a los tratamientos PCL y Control.

Cuadro 3 y Grafica 3. Índice de conversión alimenticia (IC) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.

Tratamiento	Índice de conversión Media \pm EE
PCL	1.56 \pm 0.0333 ^a
AFB 200	2.40 \pm 0.0577 ^c
Mezcla AFB + PCL	2.00 \pm 0.0000 ^b
Control	1.70 \pm 0.1000 ^a



PCL= Paredcelular de *Saccharomyces cerevisiae* 0.5 Kg/Ton, AFB= Aflatoxina 200= 200 μ g/Kg, \pm EE= error estándar, Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

- El tratamiento PCL, aunque obtuvo la media más baja del experimento no muestra diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) si se compara con el grupo Control, pero si se presenta si se compara con los tratamientos AFB 200 y Mezcla.
- El tratamiento que obtuvo las medias más altas fue el de AFB 200, cabe destacar en este punto que este tratamiento obtuvo las medias más bajas en el apartado del peso final de los animales.
- El tratamiento Mezcla fue el segundo con la media más alta del tratamiento, lo que pudiera indicar que las PCL tuvo un efecto positivo al interactuar con las aflatoxinas.

Discusión:

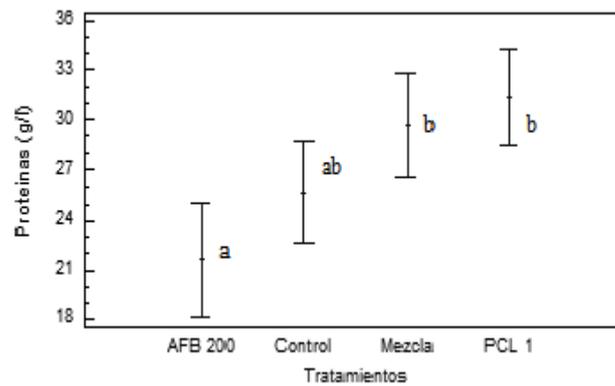
Es importante notar el hecho de que al adicionarse la PCL en las dietas de pollo de engorda, muestren un efecto positivo en el apartado del índice de conversión alimenticia, ya que el tratamiento PCL obtuvo el índice de conversión más bajo del experimento, así mismo, en el tratamiento Mezcla se pudo observar el efecto positivo sobre las aflatoxinas ya que disminuyó significativamente el índice de conversión si se compara con el tratamiento AFB 200.

Este mismo efecto es reportado por Santin en el 2003¹⁰³, en donde los tratamientos a los que le adiciono PCL mostraron los mejores índices de conversión alimenticia en comparación a los grupos controles y a los que tenían algún contenido de aflatoxinas.

Los autores Santin en el 2001¹¹¹, Iji en el 2001¹¹² y Rosen en el 2005¹⁴⁸ señalan que las PCL son de los promotores nutricionales que más influyen en la función intestinal, favoreciendo a las vellosidades intestinales mediante un efecto trófico de estas, lo que se traduce en un aumento de la superficie de contacto en el intestino con el alimento, favoreciendo así la digestibilidad y absorción de los nutrientes contenidos en el alimento.

Cuadro 4 y Grafica 4. Concentración de proteínas totales (g/L) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.

Tratamiento	Proteínas totales Media \pm EE (g/L)
PCL	31.40 \pm 1.12 ^b
AFB 200	21.60 \pm 4.07 ^a
Mezcla AFB + PCL	29.70 \pm 2.15 ^b
Control	25.65 \pm 0.62 ^{ab}



PCL= Paredcelular de *Saccharomyces cerevisiae* 0.5 Kg/Ton, AFB= Aflatoxina 200= 200 μ g/Kg, \pm EE= error estándar, Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

- En el cuadro 4 se observa que la concentración de proteínas totales es menor en el tratamiento AFB 200 si se compara con los demás tratamientos, aunque no tiene diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) con el tratamiento Control, pero si se presenta una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparándolo con los tratamientos en los que se suplemento la PCL.
- Los tratamientos en los que se suplemento PCL obtuvieron las medias más altas de proteínas totales del experimento, obteniendo una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparándose con el tratamiento AFB 200 mas no así en comparación con el tratamiento control.

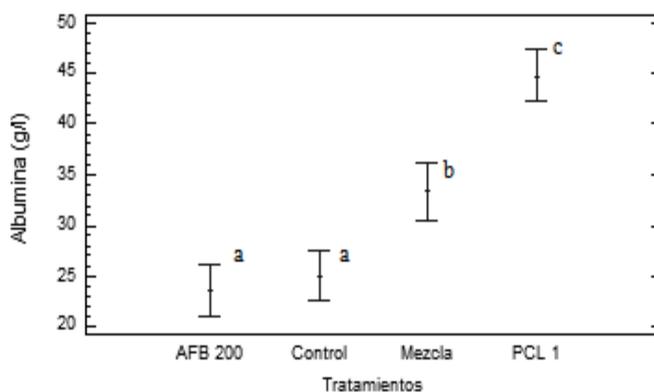
Discusión:

La comparación de las concentraciones de proteínas totales en los distintos tratamientos presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), estos resultados coinciden con los de otros autores como Devegowda en 1995¹⁴⁹, Nilson en 2004¹⁵⁰ y Dimovelis en 2004¹⁵¹, quienes obtuvieron concentración de proteínas totales significativamente menores en los tratamientos en donde adicionaron aflatoxinas a las dietas de pollos de engorda y posteriormente incrementaron al incluir PCL en las mismas dietas con aflatoxinas.

El hecho de que el tratamiento AFB 200 presente una baja concentración de proteínas totales puede deberse a una mala composición de la dieta, pérdidas de proteínas plasmáticas por presencia de hemorragias o bien por la incapacidad del hígado para producir albumina debido a la presencia de hepatitis, cirrosis o alguna otra patología del hígado; siendo estos, problemas conocidos causados por las aflatoxinas y es de destacar el efecto positivo que se presentó en los tratamientos con PCL aumentando la concentración de proteínas plasmáticas.

Cuadro 5 y Grafica 5. Concentración de albumina (g/L) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.

Tratamiento	Albumina Media \pm EE (g/L)
PCL	44.78 \pm 1.50 ^c
AFB 200	23.60 \pm 1.47 ^a
Mezcla AFB + PCL	33.42 \pm 3.15 ^b
Control	23.96 \pm 1.20 ^a



PCL= Paredcelular de *Saccharomyces cerevisiae* 0.5 Kg/Ton, AFB= Aflatoxina 200= 200 μ g/Kg, \pm EE= error estándar, Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

- En el cuadro 5 se observa que el tratamiento PCL obtuvo la concentración de albumina más alta del experimento obteniendo una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en comparación con los otros tres tratamientos.
- Se puede observar que los tratamientos AFB 200 y Control obtuvieron las concentraciones más bajas mostrando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparados con los tratamientos a los que se le suplementó la PCL, el tratamiento Mezcla obtuvo resultados más elevados de estos dos tratamientos pero menores al tratamiento PCL, lo cual pudiera indicar que la PCL actuó positivamente sobre las aflatoxinas.

Discusión:

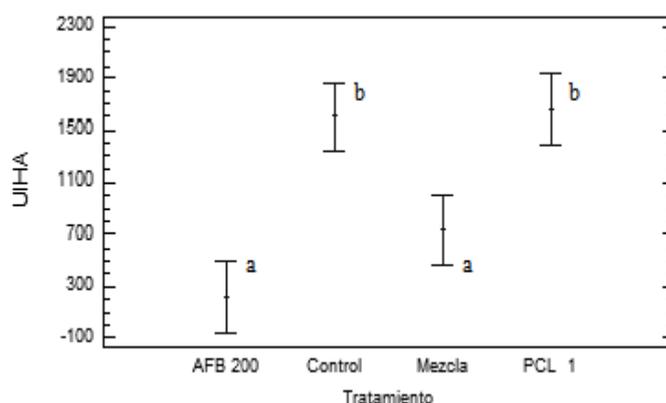
El tratamiento AFB 200 indica que los niveles bajos obtenidos de albumina en comparación con los otros tratamientos fue debido al efecto toxico que tienen las aflatoxinas sobre el hígado, ya que este órgano es el responsable de proveer las proteínas que ayudan a regular la presión osmótica, las disminuciones de albumina más comunes se producen por la pérdida de esta proteína por vía urinaria, perdida intestinal o bien por disminución en su síntesis.¹⁵²

El autor Raju en el 2000¹⁰⁸ reporta una disminución de las concentraciones de albumina de pollos de engorda que consumieron dietas contaminadas con aflatoxinas, coincidiendo así con los resultados del presente trabajo, sin embargo el autor Tedesco en el 2004¹⁵³ menciona que no se observaron cambios en las concentraciones de la proteína, esto se pudiera explicar porque la dosis de aflatoxina que utilizó el autor fue menor a la que se utilizó en el presente trabajo (100 µg/Kg).

Es notable que al haber utilizado las PCL junto con las AFB en la dietas, funciono positivamente en las concentraciones de albuminadas a la capacidad adsorbente de aflatoxinas que poseen las PCL.¹⁵⁴

Cuadro 6 y Grafica 6. Inhibición de la Hemoaglutinación (UIHA) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.

Tratamiento	Media \pm EE (UIHA)
PCL	1664 \pm 221.7 ^b
AFB 200	224 \pm 55.40 ^a
Mezcla AFB + PCL	736 \pm 55.42 ^a
Control	1600 \pm 258.6 ^b



PCL= Paredcelular de *Saccharomyces cerevisiae* 0.5 Kg/Ton, AFB= Aflatoxina 200= 200 μ g/Kg, \pm EE= error estándar, Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

- En el cuadro 6 se observa que los tratamientos a los que se le administro aflatoxinas, tuvieron una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en comparación con los otros dos tratamientos, obteniendo los títulos de anticuerpos más bajos para la enfermedad de Newcastle. El tratamiento Mezcla a pesar de no tener diferencia estadística con el tratamiento AFB 200, presento un leve aumento en los títulos de anticuerpos en comparación con este.
- Los tratamientos PCL y Control obtuvieron títulos altos de anticuerpos contra Newcastle sin obtener diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre ellos, pero comparados con los tratamientos en los que se le administro aflatoxinas, si se obtuvo una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Discusión:

Distintos investigadores como Azzam en 1998¹⁵⁵, Gabal en 1998¹⁵⁶, Mani en 2001¹⁵⁷ y Saume en 2001¹⁵⁸, encontraron una disminución de los títulos de anticuerpos en pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con aflatoxinas en dosis de entre 100 y 300 µg/Kg, el autor Saume en 2001¹⁵⁸ en su trabajo utilizó los mismos contenidos de aflatoxinas que se utilizaron en el presente trabajo, mostrándose la misma disminución de los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle.

El tratamiento Mezcla mostro un leve aumento de los títulos de anticuerpos comparado con el tratamiento AFB 200, aunque no se marcó una diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre ambos tratamientos, pero aunque el aumento de los títulos fue muy poco se puede decir que las PCL actuaron como adsorbente de las aflatoxinas, Gómez en 2009¹⁵⁹ menciona que las dietas para pollos de engorda suplementadas con PCL mejoran los parámetros productivos ya que secuestran a las aflatoxinas para no dejarlas biodisponibles en el organismo mejorando así también la respuesta vacunal.

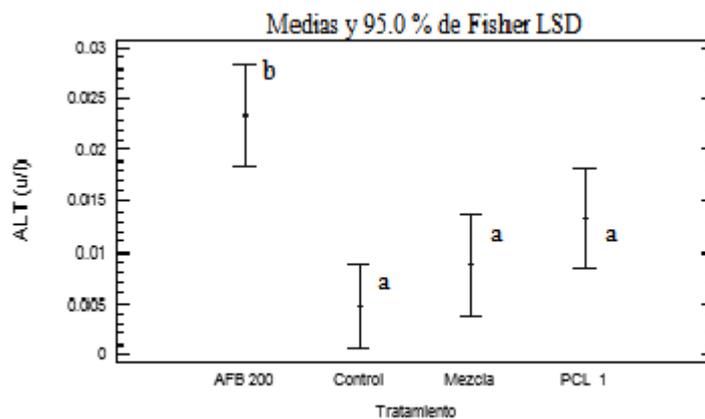
En el presente trabajo se hace notar que la adición de PCL incrementó los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle, esto concuerda con lo publicado por investigadores como Shashidhara en 2003¹⁶⁰ quien utilizó una fracción purificada de PCL, mostrándose un aumento significativo en el título de anticuerpos de las aves que consumieron esa dieta.

Cuadro 7. Concentración de enzimas séricas (ALT, AST y FAS) (u/L) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.

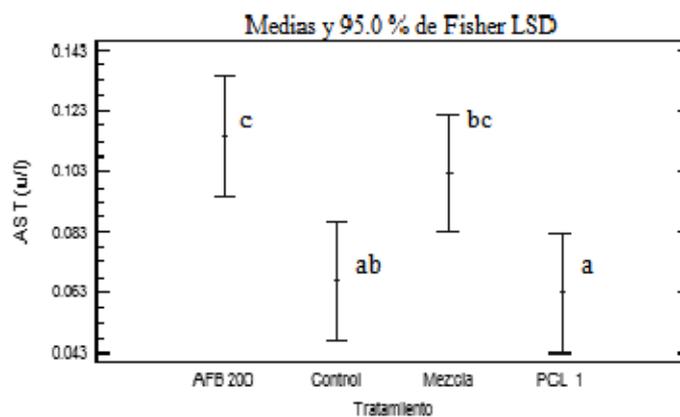
Tratamiento	ALT Media ± EE (u/L)	AST Media ± EE (u/L)	FAS Media ± EE (u/L)
PCL	0.013 ± 0.0016 ^a	0.062 ± 0.0200 ^a	0.005 ± 0.0200 ^a
AFB 200	0.023 ± 0.0059 ^b	0.114 ± 0.0075 ^c	0.012 ± 0.0075 ^c
Mezcla AFB + PCL	0.008 ± 0.0024 ^a	0.102 ± 0.0064 ^{bc}	0.007 ± 0.0064 ^b
Control	0.004 ± 0.0016 ^a	0.067 ± 0.0135 ^{ab}	0.004 ± 0.0135 ^a

PCL= Paredcelular de *Saccharomyces cerevisiae* 0.5 Kg/Ton, AFB= Aflatoxina 200= 200 µg/Kg, ± EE= error estándar, Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

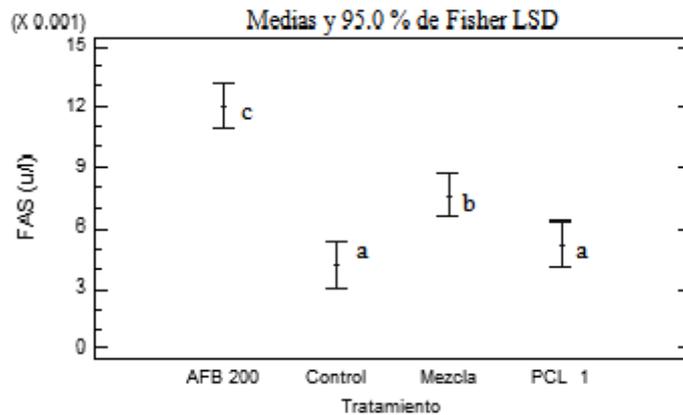
Grafica 7. Concentración de Alanina Amino Transferasa (u/L) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.



Grafica 8. Concentración de Aspartato Amino Transferasa (u/L) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.



Grafica 9. Concentración de Fosfatasa Alcalina (u/L) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.



- En el cuadro 7 se puede ver que para la ALT, el tratamiento AFB 200 obtuvo la concentración más alta del experimento mostrando una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en comparación con los demás tratamientos. Los tratamientos a los que se le administro PCL y el grupo Control mostraron concentraciones bajas de esta enzima aunque entre ellos no se presentó diferencia estadística significativa ($p > 0.05$). El tratamiento Mezcla fue el que obtuvo la segunda concentración más baja, si se compara con el tratamiento AFB 200, la disminución de la enzima ALT pudo haberse presentado por el efecto positivo de la interacción de las PCL con las aflatoxinas.
- Se puede observar que la concentración de la enzima AST fue más alta en los tratamientos en los que se administró aflatoxina, el tratamiento AFB 200 fue el que presento medias más altas presentando una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento PCL y al Control. La concentración de tratamiento Mezcla fue la segunda más alta mostrando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el tratamiento PCL, mas no así con los otros dos tratamientos. Si se compara la concentración de la enzima en el tratamiento Mezcla con la concentración presente en el tratamiento AFB 200, podemos observar una leve disminución de esta, esto pudo ser debido a los efectos que tienen las PCL sobre las aflatoxinas. El tratamiento PCL obtuvo las medias más bajas del experimento mostrando una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con los tratamientos a los que se le administro

aflatoxinas, pero no mostro diferencia estadística significativa ($p>0.05$) con el tratamiento Control, ya que obtuvieron medias muy parecidas.

- En el cuadro 7, se puede observar que el tratamiento AFB 200 tuvo la concentración de FAS más alta del experimento obteniendo así una diferencia estadística significativa ($p<0.05$) con respecto a los demás tratamientos. El tratamiento Mezcla obtuvo la segunda concentración más alta, mostrando así una diferencia estadística significativa ($p<0.05$) si se compara con los otros tres tratamientos. Los tratamientos que mostraron las medias más bajas fueron el tratamiento PCL y Control, no mostrando diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre ellos, pero sí se mostró al compararse con los tratamientos a los que se le administro las AFB.

Discusión:

La enzima ALT se encuentra principalmente en hígado y en menores cantidades también en riñones, corazón y musculo; cuando se presenta una lesión en alguno de estos órganos, los niveles de esta enzima aumentaran y tomando en cuenta que el órgano blanco de las aflatoxinas es el hígado, se puede deducir que el incremento de la concentración de la ALT en el tratamiento AFB 200 se debe a las lesiones provocadas por las toxinas en el hígado. Los autores Oguz en 2002¹⁶¹ y Surai en 2005¹⁶² reporta un incremento en las concentraciones de la ALT en pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con aflatoxinas (50-100 ppb), esto debido probablemente a lesiones histológicas encontradas en los hígados de estos pollos. El hecho de que en el tratamiento Mezcla se encontraran concentraciones más bajas en comparación con el tratamiento AFB 200 puede deberse a la acción adsorbente que ejercen las PCL sobre las aflatoxinas.

La enzima AST se localiza en varios tejidos del organismo y cuando alguno de estos llega a presentar algún daño se pueden encontrar altas concentraciones de esta enzima en el suero. Valdivia en 2001¹⁶³ reporta un incremento de esta enzima en pollos de engorda que consumieron alimento contaminado con aflatoxina a una dosis de 70 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, esta dosis es menor a la usada en el presente trabajo, con lo que se puede decir que a un mayor contenido de aflatoxina, como se utilizó en este trabajo (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), la magnitud de los efectos negativos de las toxinas se verá incrementada. En este apartado se recalca de nuevo el efecto positivo que tuvieron las PCL, se sugiere así, que la severidad de las aflatoxinas puede ser disminuida con la adición de este producto en las dietas.

En los resultados de este trabajo se muestra el aumento de la enzima FAS en los tratamientos que consumieron alimento contaminado con aflatoxinas, debido muy seguramente al daño celular ocasionado por las toxinas. Denli en el 2009¹⁶⁴ menciona que el consumo de alimento contaminado con aflatoxinas (100 ppb) en pollos de engorda mostro un aumento en la concentración de FAS, en tal trabajo se demostró que la presencia de aflatoxinas, aumenta la presencia de la enzima en sangre debido al daño celular que ocasionan las aflatoxinas. El mismo resultado se pudo observar en el presente trabajo, al obtener concentraciones mayores de FAS en el tratamiento AFB

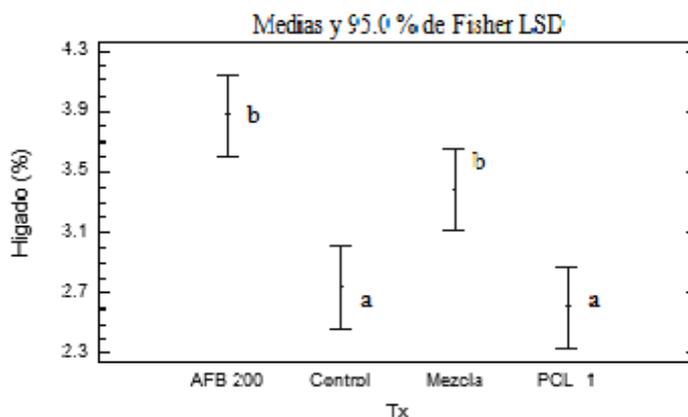
200. Así mismo en el presente trabajo se pudo observar el efecto benéfico que mostraron las PCL en el tratamiento Mezcla, ya que no solo se han observado cambios positivos en las variables productivas sino que además estos efectos positivos también pueden ser observados en la dinámica enzimática, Stanley en 1993¹⁶⁵ menciona que la adición de PCL (1 Kg/Ton) a dietas contaminadas con aflatoxinas para pollos de engorda no mostró eficacia para disminuir los efectos negativos de las toxinas, con esto, se puede pensar que el contenido utilizado en este experimento (0.5 Kg/Ton) es más eficaz contra las aflatoxinas.

Cuadro 8. Peso relativo de órganos (Hígado, riñón, bazo, bolsa cloacal %) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.

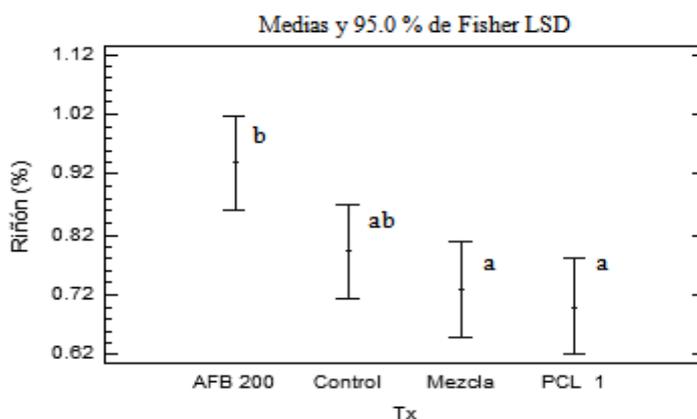
Tratamiento	Hígado Media ± EE (%)	Riñón Media ± EE (%)	Bazo Media ± EE (%)	Bolsa cloacal Media ± EE (%)
PCL	2.61 ± 0.13 ^a	0.70 ± 0.0395 ^a	0.18 ± 0.003 ^{bc}	0.18 ± 0.011 ^b
AFB 200	3.87 ± 0.27 ^b	0.93 ± 0.0481 ^b	0.09 ± 0.010 ^a	0.13 ± 0.007 ^a
Mezcla AFB + PCL	3.38 ± 0.08 ^b	0.73 ± 0.6895 ^a	0.14 ± 0.003 ^b	0.15 ± 0.004 ^a
Control	2.74 ± 0.18 ^a	0.79 ± 0.0763 ^{ab}	0.21 ± 0.027 ^c	0.19 ± 0.008 ^b

PCL= Paredcelular de *Saccharomyces cerevisiae* 0.5 Kg/Ton, AFB= Aflatoxina 200= 200 µg/Kg, ± EE= error estándar, Literales diferentes se consideran con diferencia estadística significativa $\alpha < 0.05$

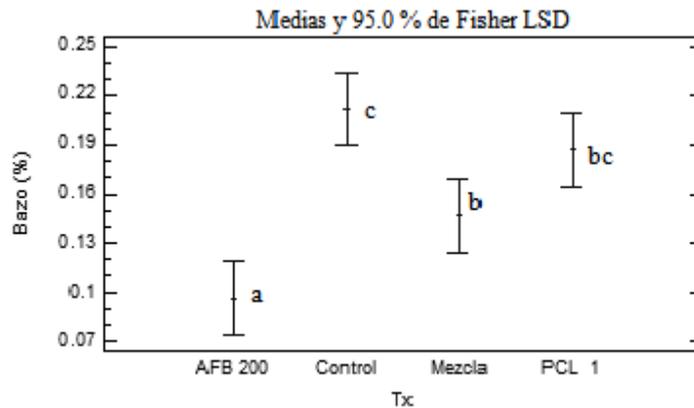
Grafica 10. Peso relativo de Hígado (%) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.



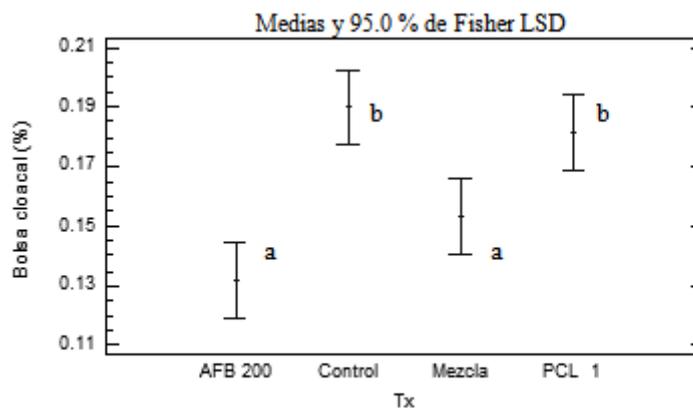
Grafica 11. Peso relativo de riñón (%) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.



Grafica 12. Peso relativo de bazo (%) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.



Grafica 13. Peso relativo de bolsa cloacal (%) mostrando medias y error estándar en pollos de engorda que consumen alimento suplementado con PCL y/o AFB.



- En el cuadro 10 se puede apreciar que para el hígado los tratamientos que contenían AFB en las dietas, mostraron órganos más grandes y por ende de mayor peso mostrando una diferencia estadística ($p < 0.05$) con los tratamientos PCL y Control.
- Se puede apreciar que para el riñón, el tratamiento AFB 200 mostró el órgano más grandes y por ende de mayor peso, mostrando una diferencia estadística ($p < 0.05$) con los otros 3 tratamientos, estos tratamientos registraron medias similares sin mostrar diferencia estadística ($p > 0.05$) entre ellos.
- Los pesos más bajos que se registraron con respecto al bazo fueron los del tratamiento AFB 200 mostrando una diferencia estadística ($p < 0.05$)

comparándolo con los demás tratamientos, el tratamiento Mezcla obtuvo mejores pesos mostrando una diferencia estadística con los tratamientos AFB 200 y Control, siendo este último tratamiento el que mayor medias registro marcando una diferencia estadística ($p < 0.05$) si se compara con los tratamientos que contenían AFB; el tratamiento PCL a pesar de tener medias altas, solo marca una diferencia estadística con el tratamiento AFB 200.

- Respecto a la bolsa cloacal los tratamientos que registraron mejores pesos del órgano, fueron los tratamientos PCL y Control obteniendo una diferencia estadística ($p < 0.05$) comparados con los tratamientos a los que se le administró AFB; el tratamiento AFB 200 a pesar de tener medias más bajas que el tratamiento Mezcla no marcó una diferencia estadística ($p < 0.05$) con este último.

Discusión:

En el presente trabajo se observó que los pollos de engorda que consumieron dietas suplementadas con PCL mostraron pesos relativos menores de hígado y riñón en comparación a las aves que consumieron dietas contaminadas con aflatoxinas, esto, debido a que el principal órgano blanco de las aflatoxinas es el hígado, pudiendo provocar un proceso inflamatorio de curso crónico en este órgano y una tumefacción celular en riñones como lo comentan los autores Aravind en 2003¹¹⁶ y Girish en 2004¹¹⁷.

Con respecto a los órganos linfoides como bazo y bolsa cloacal, los peores pesos se registraron en el tratamiento AFB 200 ya que al igual que en el hígado, actúan negativamente sobre estos órganos, en este caso provocando depleción linfoide y atrofia de dichos órganos como lo refieren los autores Perozo en 2003¹⁶⁶ y Torrealba en 2001¹⁶⁷, que en sus respectivos trabajos obtuvieron resultados semejantes a los expuestos en este trabajo. Guo en 2003¹²⁶ y Ao en 2004⁷⁵ mencionan un incremento de los pesos relativos del bazo y la bolsa cloacal en aves que consumían alimento contaminado con aflatoxinas y al que se le adiciono PCL en dosis de 1 Kg/Ton, en el presente trabajo se pudo observar lo mismo, con la diferencia que el contenido que se utilizo fue menor (0.5 Kg/Ton), indicando que aun a contenidos bajos, las PCL pueden actuar de manera efectiva hacia las aflatoxinas.

Así se puede señalar que las PCL actuaron de manera positiva al secuestrar de manera efectiva a las aflatoxinas para evitar el impacto negativo de estas sobre el hígado, riñón, bazo y bolsa cloacal.

9. CONCLUSIONES.

El uso de las **PCL** como suplemento en las dietas (0.5 Kg/Ton), mejoro los parámetros productivos (consumo de alimento, índice de conversión alimenticia y ganancia de peso), esto se traduce en un mejor desempeño de los animales en la producción trayendo consigo mejores beneficios para el productor avícola.

Las PCL demostraron ser eficaces en dietas contaminadas con aflatoxinas (200 $\mu\text{g/Kg}$), disminuyendo sus efectos negativos y mejorando los parámetros productivos de los pollos que consumieron aquella dieta.

El uso de las PCL adicionadas en el alimento contaminado con aflatoxinas, obtuvo una buena respuesta en la concentración de proteínas totales y de albumina, lo que indico que el hígado reacciono favorablemente a la presencia de este producto, cabe recordar que el hígado es el lugar en donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas y por lo tanto un hígado sano tendrá niveles óptimos de proteínas.

El contenido de aflatoxinas a 200 $\mu\text{g/Kg}$ en el alimento del pollo de engorda, impactó de manera negativa sobre la respuesta vacunal hacia la enfermedad de Newcastle, pero la adición de las PCL mejoro la respuesta a la vacunación mostrando títulos de anticuerpos más altos, esto, debido a la capacidad que tienen para secuestrar a las aflatoxinas y no dejarlas biodisponibles para su absorción, evitando así los efectos que pudieran ocasionar sobre la inmunidad.

La concentración de las enzimas ALT, AST y FAS se vieron alteradas cuando las aflatoxinas se encontraban en el alimento, sin embargo, la concentración de estas enzimas disminuyo en el tratamiento en donde las aflatoxinas interactuaron con las PCL, lo que indica que las PCL actuaron de manera efectiva en el secuestro de las toxinas, disminuyendo así los efectos tóxicos sobre sus órganos blancos.

La utilización de las PCL redujo los efectos negativos de las aflatoxinas, este efecto se apreció en el peso relativo del hígado y riñón, mostrando mejores pesos de los órganos cuando estos dos compuestos interactuaron en comparación con el tratamiento que solo contenía aflatoxinas.

Los órganos linfoides como bazo y bolsa cloacal, obtuvieron mejores pesos en la dieta en la que se administraron las PCL si se compara con el tratamiento al que solo se le administro aflatoxinas, demostrando así que las PCL actuaron de manera efectiva hacia las toxinas disminuyendo sus efectos negativos sobre estos órganos, lo que significa una mejora en la inmunidad de las aves y por lo tanto un mejor desempeño productivo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

-
- ¹Lastra, M. J., et al., 2000, La producción de carnes en México y sus perspectivas. Centro de estadística agropecuaria, SAGARPA, México, 1-54.
- ²Gallardo, N. J., et al., 2004, Situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México. Coordinación general de ganadería, SAGARPA, México, 1-27.
- ³Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2014, Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011-2020. Subsecretaría de fomento a los agronegocios, 1-42
- ⁴Unión Nacional de Avicultores (UNA), 2010, Compendio nacional de indicadores económicos. www.una.org.mx.
- ⁵Gimeno A. 2011, Micotoxicosis en Animales y Humanos. SpecialNutrientsInc, USA.
- ⁶Ramesh V. et al., 1999, Tercera conferencia internacional FAO/OMS/PMA sobre micotoxinas. Túnez, 1-13.
- ⁷Gimeno A., 1991, Memorias VII Curso de especialización en nutrición y patología. Fundación Española para el desarrollo de la nutrición animal. Ingenieros agrónomos, España, 1-53.
- ⁸Deborah C., 2010, Micotoxicosis. Revista Plan Agropecuario, Enero-Febrero, 45-50.
- ⁹Christensen, C.M. y Sauer, D.B. Micoflora in Storage of Cereal Grains and their Products. Ed. American Association of Cereal Chemists, 23:7, 219-240.
- ¹⁰Soriano del Catillo, J.M., 2007, Micotoxinas en alimentos. Ed. Díaz de Santos, España, 3-13.
- ¹¹D'Mello, J.P.F. y Macdonald, A.M.C, 1999, Mycotoxins. Animal Feed Science and Technology, 22:8, 155-166.
- ¹²Gimeno A., 1999, Revisión genérica del problema de los hongos y las micotoxinas en la alimentación animal. Publicaciones técnicas: SpecialNutrients, Inc, Miami, 32:4, 1-53.
- ¹³ Gimeno A., 2000, Problemas de micosis y micotoxicosis en pollos. Portugal, 1-30.
- ¹⁴McEvoy, et al., 2002, Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. AnalyticaChimicaActa, 473:9, 1-10.
- ¹⁵Adebajo, L. O. et al., 1994, Mould contamination and the influence of water activity and temperature on mycotoxin production by two *Aspergilli* in melon seed. Natrung 38:7, 209-217.
- ¹⁶ Abarca Lourdes, 2000, Taxonomía e identificación de especies implicadas en la Aspergilosis nosocomial. Revistalberoamericana de Micología 17:3, 79-84.
- ¹⁷Gqaleni, N., et al., 1997, Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. Applied and Environmental Microbiology 6:11, 1048-1053.
- ¹⁸Klich, M., A., 1992, A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of FoodProcessing. North Ryde, Australia.
- ¹⁹Eguiazú, G., M., 1984, Comportamiento de almacenaje del girasol III. Grasas y Aceites 3:6, 325-329.
- ²⁰Lacey, J., 1989, Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. Journal of Applied Bacteriology, Symposium supplement. 356:7, 11-25.
- ²¹Pitt, J. I., 1997, Fungi and Food Spoilage. 2º ed. Blackie Academic & Professional. UK.
- ²²Mei-chin, Y. et al., 1999, Inhibitory effect seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* Species. International Journal of Food Microbiology, 49:11, 49-56.
- ²³Kurts., S., 2000. Micotoxinas peligro ocultos en los alimentos. Programa regional post-cosecha. Nicaragua.
- ²⁴Hesseltine, C. et al, 1990, Taxonomic Studies of the aflatoxina producing Strains in the *Aspergillus flavus* group. Micologia, 8:3, 123-132

-
- ²⁵Massey, T., E., et al., 2000, Mechanisms of aflatoxin B1 lung tumorigenesis. *Exp. Lung. Res.* 3:7, 673-683.
- ²⁶Klich, M., A., et al., 2000, *Aspergillus* systematics and the molecular genetics of micotoxina biosynthesis. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Academic Publishers, 84:10, 425-434.
- ²⁷Ito, Y., et al., 2001, *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research*, 105:2, 233-239.
- ²⁸Peterson, S., W., et al., 2000, Genetic variation and aflatoxin production in *Aspergillus tamarii* and *A. caelatus*. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Academic Publishers, 81:11, 447-458.
- ²⁹Moss, M., O., 1991, The environmental factors controlling mycotoxin formation. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, 23:7, 37-56.
- ³⁰Maggon, K., K., et al., 1977, Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol. Rev.* 7:5, 822-855.
- ³¹Townsend C., A., et al., 1984, Hexanoate as a starter unit in polyketide synthesis. *Chem. Soc.* 4:10, 3868-3869.
- ³²Krishna, S., B., 1991, Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. *Mycotoxins in Ecological Systems*, 8:3, 59-85.
- ³³Huff, W., E., et al., 1983, Individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin on bruising in broiler chickens. *PoultSci* 62:7, 1764-1771.
- ³⁴Hsieh, D., P., et al., 1977, Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. The toxicology of aflatoxins. *Mycotoxins in Ecological Systems*, 20:1, 79-85.
- ³⁵Patterson, D., S., P., et al., 1970, The formation of aflatoxins B2a and G2a and their degradation products during the *in vitro* detoxification of aflatoxin by liver of certain avian and mammalian species. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 3:8, 527-538.
- ³⁶Yunus, W., A., 2011, Aflatoxin B1 in Affecting Broiler's Performance, Immunity, and Gastrointestinal Tract: A Review of History and Contemporary Issues. *Toxins* 3:2, 566-590.
- ³⁷Ellis, W., O., et al., 1991, Aflatoxins in food: Occurrence, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of Control. *Food Science and Nutrition* 30:1, 403-439.
- ³⁸Jia-Sheng, et al., 1999, DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research*. 424:3, 167- 181.
- ³⁹Kiessling, K., H., 1986, Biochemical mechanism of action of mycotoxins. *Pure and Applied Chemistry* 13:2, 327-338.
- ⁴⁰Eaton, et al., 1994, Biotransformation of aflatoxins. *Veterinary and Agricultural Significance*, 4:1, 45-71.
- ⁴¹Terao, K., et al., 1991, Biological activities of mycotoxins: field and experimental mycotoxicoses. CRC Press, 23:8, 455-497.
- ⁴²Cullen, J., M., et al., 1994, Acute Hepatotoxicity of Aflatoxins. *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Academic Press, Inc, 13:6, 3-26.
- ⁴³Mallmann, C., A., et al., 2003, Micotoxinas y micotoxicosis. *Laboratorio de analisis micotoxicologicos*. Universidad Federal de Santa Maria. Brasil.
- ⁴⁴Kubena, W., E. et al., 1990, Efficacy of a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poultry Sci*, 69:6, 1078-1086.
- ⁴⁵Quist, C., F., et al., 2000, The effect of dietary aflatoxin on wild turkey poult. *J Wildl Dis.*, 136:3, 436-444.
- ⁴⁶Doerr, J., A., et al., 1983, Effects of low level aflatoxicosis in broiler chickens. *PoultSci*, 62:8, 1971-1977.
- ⁴⁷Rao, V., N., et al., 1993, Effect of certain drugs on acute induced aflatoxicosis in chicken Indian vet. *Journal. India*. 70:4, 344-347.
- ⁴⁸Espada, Y., M., et al., 1992, Pathological lesion following an experimental intoxication with aflatoxin B1 in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 53:9, 275-279.

-
- ⁴⁹Kumar, A., A., et al., 1993, Clinicopathological changes in experimental aflatoxicosis in quail. *Ind. J. Poult. Sci. India.* 28:8, 150-153.
- ⁵⁰Arango, M., C., 1997, Micotoxinas y salud. Departamento de Ciencias básicas de la Salud, facultad de Ciencias para la salud. Universidad de Caldas. Colombia.
- ⁵¹Kromidas, S., 2006, HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 3-70.
- ⁵²Chu, F., S., 1992 Recent Progress on Analytical Techniques for Mycotoxins in Feedstuffs. *J. Anim. Sci.* 70:1, 3950–3963.
- ⁵³Haugen, A. y Groopman, J., D., 1981, Monoclonal antibody to aflatoxin B1-modified DNA detected by enzyme immunoassay *Proc. Natl Acad. Sci.* 78: 7, 4124-4127.
- ⁵⁴Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 1999, Aflatoxin in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter, Immunoaffinity Column Aflatest Method Aflatest P column, Vicam LP, 313 Pleasant Street, Watertown, MA 02472, USA.
- ⁵⁵Jand, S., K., et al., 1995, Observations on occurrence of poultry with mycotoxins diseases associated in feed. *Ind. J. Anim. Sci. India.* 65:1, 1063–1067.
- ⁵⁶Leeson, S., et al., 1995, Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books. Guelph, Ontario. Canada.
- ⁵⁷Shetty, P., H., et al., 2000, *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology.* 17:8, 48–55.
- ⁵⁸Castagliuolo, I., et al., 1999, *Saccharomyces boulardii* Protease Inhibits the Effects of *Clostridium difficile* Toxins A and B in Human Colonic Mucosa. *Infect. Immun.* 67:3, 302-307.
- ⁵⁹Mewes, H., W., et al., Overview of the yeast genome. *Nature.* 387:3, 7-9.
- ⁶⁰Stewart, G., G., et al., 1998 An introduction to brewery science & technology. Series III. Brewer's yeast. Inglaterra.
- ⁶¹Cuaron, I., J., A., 2000, La influencia de la levadura en la dieta, respuesta microbiológica antagonista. *Proc. Anais do Simposio sobre Aditivos Alternativos na Nutricão Animal.* 23:7, 16-17.
- ⁶²Newbold, C., J., 2003, Principles for the use in ruminant nutrition. Role of probiotics and their links to the demand of European consumers report. *Probiotics.* 7:1, 29-40.
- ⁶³Adams, C., A., 2004, Nutricines in poultry production: focus on bioactive feed ingredients. *Nutrition Abstracts and Reviews: series B.* 74:2, 1-12.
- ⁶⁴Romero, R., et al., 2003, Yeast and yeast products, past, present and future: from flavour to nutrition and health. *Nutritional biotechnology in the feed and food industries.* 83:11, 365-371.
- ⁶⁵Aguilar, U., B., et al., 2001, A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37:1, 268-274.
- ⁶⁶Klis, F., M., et al., 2002, Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:9, 239-256.
- ⁶⁷Kollár, R., et al., 1997, Architecture of yeast cell wall: β 1-6-glucan interconnects mananoprotein, β 1-3-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* 272:3, 23-28.
- ⁶⁸Patterson, J., A., et al., 2003, Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82: 1, 627-631.
- ⁶⁹Nilson, R., et al, 2004, Use of Brewer's yeast to replace part of the vitamin mineral premix in finisher diets. The World's Poultry Science Association. WPSA. Turquia.
- ⁷⁰Sparks, M., et al., 2005, Yeast different sources and levels as protein source in diets of reared piglets: effects on protein digestibility and N-metabolism. *J. Ani. Physiol. Nutr.* 89:3, 184-188.

-
- ⁷¹Kocher, A., 2005, The new frontier in poultry nutrition. 17 Annual Australian Poultry Science Symposium. The Poultry Research Foundation. Australia.
- ⁷²Rosen, G., D., 1995, Antibacterials in poultry and pig nutrition. *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. 34:1, 143-472.
- ⁷³Hooge, D., M., 2004, Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide. *Int. Journal Poult. Sci.* 83:4, 163-174.
- ⁷⁴Pettigrew, J., E., 2000, Mannan oligosaccharides effects on performance reviewed. *Feedstuffs*. 25:8, 12-14.
- ⁷⁵Ao, Z., et al., 2004, The use of oligosaccharides to improve broiler performance. CD in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- ⁷⁶Hofacre, C., L., et al., 2004, Competitive exclusion Mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. *J. Appl. Poult. Res.* 2004. 12:2, 60-64.
- ⁷⁷Jamroz, D., et al., 2006, Response of broiler chickens to the diets supplemented with feeding antibiotic or mannan oligosaccharides. *Journal of Polish Agricultural Universities*. 7:1, 51-57.
- ⁷⁸Kannan, M., et al., 2005, Influence of Prebiotics Supplementation on Lipid Profile of Broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 4:7, 994-997.
- ⁷⁹Sun, X. et al., 2005, Broiler Performance and Intestinal Alterations when Fed Drug-Free Diets. *Poult. Sci.* 84:7, 1294-1302.
- ⁸⁰Fairchild, A. S. et al., 2001, Effects of hen age, Bio-Mos, and Flavomycin on poult susceptibility to oral *Escherichia coli* challenge. *Poult. Sci.* 80:2, 562-571.
- ⁸¹Parks, C. W. et al., 2002, Growth performance and immune status of turkey fed antibiotics and mannan oligosaccharide. Bremen-11th European poultry Conference.
- ⁸²Sims, M. D. et al., 2004, Effects of dietary mannan Oligosaccharide, bacitracin Methylene Disalicylate, or both on the live performance and intestinal microbiology of turkeys. *Poult. Sci.* 83:3, 1148-1154.
- ⁸³Zdunczyk, Z. et al., 2004, Caecal parameters of turkey fed diets containing mannan oligosaccharides with or without our flavomycin. Compact disk in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- ⁸⁴Jonvel, S., 1993, Use of Yeast in monogastrics. *Feed Mix*. 1:4, 7-13.
- ⁸⁵Klasing, K. C. et al., 1987, Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1. *J. Nutr.* 117:2, 1629-1637.
- ⁸⁶Buts, J. P., 2005, Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. *Rev. Gastroenterol.* 25:1, 176-188.
- ⁸⁷Corthier, G. et al., 1986, Prevention of *Clostridium difficile* induced mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii*. *Clin. J. Microbiol.* 32:7, 294-296.
- ⁸⁸Czerucka, D. et al., 1994, *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3', 5' -cyclic monophosphate induction in intestinal cells. *Gastroenterol.* 106:1, 65-72.
- ⁸⁹Pothoulakis, C. et al., 1993 *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterol.* 104:11, 1108-1115.
- ⁹⁰Qamar, A. et al., 2001, *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infect. Immun.* 69:8, 2762-2765.
- ⁹¹Tasteyre, A. Et al., 2002 Inhibition of in vivo cell adherence of *Clostridium difficile* by *Saccharomyces boulardii*. *Microbiol. Pathogen.* 32:9, 219-225.
- ⁹²Toothaker, R. D. et al., 1984, Prevention of Clindamycin-induced mortality in hamster by *Saccharomyces boulardii*. *Antimicrobial. Ag. Chemother.* 26: 1, 552-556.

-
- ⁹³Gil de Los Santos, J. R. et al., 2005, *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. *Br. Poult. Sci.* 46:2, 494-497.
- ⁹⁴Line, J. E. et al., 1997, Yeast treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* populations associated with broiler chickens subjected to transport stress. *Poult. Sci.* 76:1, 1227-1231.
- ⁹⁵Oyofe, B. A. et al., 1989, Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poultry Sci.* 68:2, 1357-1360.
- ⁹⁶Sharon, N., 1993, and H. Lis. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am.* 1993. 268:5, 82-89.
- ⁹⁷Spring, P. et al., 2000, The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broilers chicks. *Poult. Sci.* 79:1, 205-211.
- ⁹⁸Fernández, F. et al., 2000, Evaluation of the effect of mannanoligosaccharides on the competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* colonization in broiler chicks. *Avian Pathol.* 29:7, 575-581.
- ⁹⁹Chowdhury, S. R. et al., 2004, Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on performance and metabolism of laying hens. *Poult Sci.* 83:4, 1849-1856
- ¹⁰⁰Jouany, J. P. et al., 2005, How yeast cell wall components can alleviate mycotoxicosis in animal production and improve the safety of edible animal products. *J. Anim. Feed Sci.* 14:8, 171-191.
- ¹⁰¹Pier A.C. et al., 1992, Mycoses and mycotoxicoses of animals caused by aspergilli. *Biotechnol.* 23:3, 233-248.
- ¹⁰²Jelinek, C. F. et al., 1989, World wide occurrence of mycotoxins in foods and feeds, an update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72:7, 223-230.
- ¹⁰³Santin, E. et al., 2003, Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 2: 341-344.
- ¹⁰⁴Ringot, D. et al., 2005, Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochem.* 40:3, 3008-3016.
- ¹⁰⁵Stanley, V. G. et al., 2004, An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown. *Poult. Sci.* 83:3, 39-44.
- ¹⁰⁶Karaman, M. et al., 2005, Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis. *Br. Poult. Sci.* 46:394-400.
- ¹⁰⁷Murthy, T. N. K. y G. Devegowda., 2004, Efficacy of modified glucomannan Mycosorb® to adsorb aflatoxin B1 in gut conditions of broiler chickens. Compact disk in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- ¹⁰⁸Raju, M. V. L. N. y G. Devegowda., 2000, Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and hematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin. *Br. Poult. Sci.* 41:8 640-650.
- ¹⁰⁹Bradley, L. G. et al., 1994, The effect of supplementation diets with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on male poult performance and ileal morphology. *Poult. Sci.* 73: 1766-1770.
- ¹¹⁰Zhang, A. W. et al, 2005, Effects of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broilers chicks. *Poult. Sci.* 84: 1015-1021.
- ¹¹¹Santin, E. et al., 2001, Performance and intestinal mucosa development of broilers chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Appl. Poult. Res.* 10:236-244.
- ¹¹²Iji, P. A. et al., 2001 Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. *J. Sci. Food. Agric.* 81: 1186-1192.
- ¹¹³Veldman, B., 2004, Mycotoxins in the animal production chain. 275-280.
- ¹¹⁴Zaghini, A. et al., 2005, Mannan oligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: Effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues on eggs, and aflatoxin B1 in liver. *Poult. Sci.* 84:8, 825-832.

-
- ¹¹⁵Yianninkouris, A. et al., 2003, A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnol.Lett.* 25: 783-789.
- ¹¹⁶Aravind, K. L. et al., 2003, Efficacy of esterified glucomannans to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and haematological parameters in broilers. *Poult. Sci.* 82:3, 571-576.
- ¹¹⁷Girish, C. K. y G. Davegowda, 2004, Efficacy of modified glucomannanMycosorb® and HSCAS to alleviate the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- ¹¹⁸Brown, G. D. y S. Gordon, 2003, Fungal β -Glucans and mammalian immunity. *Immunity.* 19: 311-315.
- ¹¹⁹Abel, G. y J. K. Czop, 1992, Stimulation of human monocyte β -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1. *Int. J. Immunopharmacol.* 14: 1363-1373.
- ¹²⁰Czop, J.K. y K.F. Austen, 1985, A beta-glucaninhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *J. Immunol.* 134:9, 2588-2593.
- ¹²¹Machado-Caetano, et al., 1986, Immunopharmacological effects of *Saccharomyces boulardii* in healthy human volunteers. *Int. J. Immunopharmacol.* 8: 245-259.
- ¹²²Taylor, P. R. et al., 2002, The beta-glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/ macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.* 269: 3876-3882.
- ¹²³Rodrigues, A. C et al., 2000, *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* 89: 404-414.
- ¹²⁴Stanley, V. G, 2005, An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown on *Eimeria* spp.-infected litter. *Poult. Sci.* 85:40-45.
- ¹²⁵Acevedo, A. M., y M. Pedroso. 2001. Efecto del tratamiento con β 1-3 glucanoparticulado lineal por vía oral sobre la respuesta humoral a la vacuna de Newcastle en pollos. *Rev. Cub. Cie. Aví.* 25: 101-106
- ¹²⁶Guo, Y. et al., 2003, The influence of β -glucan on immune response in broiler chicks. *Immunopharmacol.Immunotoxicol.* 25:461-472.
- ¹²⁷Savage, T. F et al., 1996, The effect of feeding a mannanoligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgA, and bile IgA of Wrolstad MW male turkeys. *Poult.Sci.* 75 Suppl 1.
- ¹²⁸Malzone, A., 2000, et al. Modulation of humoral immunity in commercial laying hens by a dietary probiotic. *Poult Sci.* 79 Suppl 1, 165.
- ¹²⁹Devegowda, G., 2003, Effect of mannanoligosaccharide on immunity. *Poult Sci.* 80: 1325-1331.
- ¹³⁰Lee, N. A, 2005 Validation of Analytical Parameters of a Competitive Direct ELISA for Aflatoxin B1 in peanuts.
- ¹³¹ Benites V. et al. 2007. Evaluacion de Oligosacaridos β mananos: BioMos y Safmannan en la Productividad de Pollos de Engorda.Honduras.
- ¹³² LABORATORIOS MAVER, S.A. de C.V. Av. División del Norte No. 2830, Colonia Parque San Andrés, Regs. SAGARPA-B-0789-005 y B-0789-002.
- ¹³³Grieve, D., 2011, Manera apropiada de extraer y manipular las muestras de sangre y suero en las aves. HY-LINE, International
- ¹³⁴ Valdivia et al., 2008, Toma, Conservación y Envío de Muestras para el Laboratorio Clínico Veterinario, 1ª edición. México.
- ¹³⁵ De la Sota, 2004, Manual de Procedimientos de Enfermedad de Newcastle, SENASA. Argentina pp 20-22.
- ¹³⁶ Martínez. 2006. Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología. UNAM. México.
- ¹³⁷ Fernandez A., et al, 1995, Changes In the Prothrombin, Haematology and Serum Proteins during Experimental Aflatoxicosis in Hens and Broiler Chickens. *British PoultryScience.* 68:1, 119-122.

-
- ¹³⁸ Método UV optimizado (IFCC) para la determinación de AlaninaAminotransferasa (GPT/ALT) en suero o plasma, Wiener-Lab.
- ¹³⁹ Método UV optimizado (IFCC) para la determinación de AspartatoAminotransferasa (GOT/AST) en suero o plasma, Wiener-Lab.
- ¹⁴⁰ Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina en suero, Wiener-Lab.
- ¹⁴¹ Cardenti et al, 2006, Manual de Técnicas de Necropsia para Patología General. UNAM; México
- ¹⁴² Arce-Menocal, J., et al, 2005, Efecto de paredes celulares *Saccharomyces cerevisiae* en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos. *Téc.Pecu.Méx.* 43: 155-162
- ¹⁴³ Eshak M. G. et al., 2010, Effect of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on reduction of aflatoxicosis, enhancement of growth performance and expression of neural and gonadal genes in Japanese quail. *Journal of American Science*, 6:12.
- ¹⁴⁴ Rawal S. 2010. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science* 89:3, 325–331.
- ¹⁴⁵ Keller K.M., 2012, Efeito de parede celular de levedura sobre o desempenho produtivo de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B1. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34:2, 101-105.
- ¹⁴⁶ Dalvi, R. R. et al, 1984, Toxic effects of aflatoxin B1 in chickens given feed contaminated with *Aspergillus flavus* and reduction of the toxicity by activated charcoal and some chemical agents. *Avian Dis.* 28:1, 61-9.
- ¹⁴⁷ Oguz, H., et al, 2000, Effects in broiler during chronic aflatoxin exposure. *Res. Vet. Sci.* 66:3, 187- 191.
- ¹⁴⁸ Rosen, G. D. 2005. Halo-analysis of the effects of genetic, managemental, chronological and dietary variables on the efficacy of a pronutrient mannanoligosaccharide in broilers. *Br. Poult. Sci. Abstracts.* 1:27-29.
- ¹⁴⁹ Devegowda, G., et al, A biotechnological approach to counteract aflatoxicosis in broiler chickens and ducklings by the use of *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Proc. Feed Ingredients Asia 95*, Singapore. 161-171.
- ¹⁵⁰ Nilson, A. J., et al, 2004, Use of Brewer's yeast (*S. cerevisiae*) to replace part of the vitamin mineral premix in finisher diets. Compact disk in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- ¹⁵¹ Dimovelis, P., et al, 2004, Performance of layer fed a diet with mannan-oligosaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Mos). Compact disk in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- ¹⁵² Arana, C., et al, 2002, Differential effect of chronic aflatoxin B1 intoxication on the growth performance and incidence of hepatic lesions.
- ¹⁵³ Tedesco, D., 2004, Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. *Poult. Sci.* 83:7, 1839–1843.
- ¹⁵⁴ Gomez et al, 2009, Comportamiento Productivo y Respuesta Inmune de Pollos Alimentados con Dietas sorgo-soya con y sin Aflatoxina y Paredes Celulares de Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, *Técnicapecuaria México*, 47:3, 285-29
- ¹⁵⁵ Azzam A., 1998, Aflatoxin and Immunity in Layer Hens. *Avian Path.* 27: 3, 570-577.
- ¹⁵⁶ Gabal M., 1998, Effect on One-Day Old Layer Chicks simultaneously Vaccinated Against Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Infectious Bursa Disease. *Avian Path.* 26:290-295.
- ¹⁵⁷ Mani, K., et al, 2001, Effect of Immunomodulators on the Performance of Broilers in Aflatoxicosis. *Indian Vet. J.* 78:1126-1129.
- ¹⁵⁸ Saume E., et al, 2001, Efecto sobre Parámetros Productivos e Inmunosupresores en Pollos de Engorde por la Ingestión de Diferentes Niveles de Aflatoxina B1 en la Ración Alimenticia. V Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Maracay, 25 al 29 de Septiembre Venezuela. 96-99 pp.

-
- ¹⁵⁹Gomez et al, 2009, Comportamiento Productivo y Respuesta Inmune de Pollos Alimentados con Dietas sorgo-soya con y sin Aflatoxina y Paredes Celulares de Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, Técnica pecuaria México, 47:3, 285-297.
- ¹⁶⁰Shashidhara R. G., 2003, Effect of dietary mananoligosaccharide on breeder production traits and immunity. *PoultSci* 82:1319-1325.
- ¹⁶¹Oguz, H., 2002, Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Res. Vet. Sci.* 73:1, 101-3.
- ¹⁶²Surai, P.F., 2005, Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity. In *The Mycotoxin Blue Book*, Diaz, D.E., Ed.; Nottingham University Press: Nottingham, UK, pp. 93–137.
- ¹⁶³ Valdivia, A. et al., 2001, Efficacy of N-acetylcysteine to reduce the effects of aflatoxin B1 intoxication in broiler chickens. *Poult. Sci.* 80:8, 727–734.
- ¹⁶⁴Denli, M., 2009, Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. *Poult. Sci.* 88:7, 1444–1451.
- ¹⁶⁵ Stanley V. G., 1993, The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* 72:1867-1872.
- ¹⁶⁶ Perozo, 2003, Aflatoxina B1, Selenio y *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta inmune de pollos de engorde en el estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*, XIII 5:360-370.
- ¹⁶⁷ Torrealba, H., 2001. Los Manano-oligosacáridos un arma biotecnológica en la batalla contra las Micotoxinas. *Venezuela Avícola*, 33:19-21
- ¹⁷⁰ Método colorimétrico para la determinación de proteínas totales, Wiener-Lab.