

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS



“EFECTO DE ADSORBENTES (CLINOPTILOLITA Y MANANO OLIGOSACÁRIDOS) EN RACIONES DE POLLO DE ENGORDA CONTAMINADAS CON FUMONISINAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS

PRESENTA:

MVZ. ERNESTO DE LUCAS PALACIOS

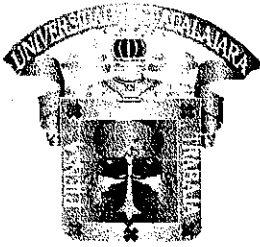
COMITÉ TUTORAL:

DRA. WALDINA PATRICIA REYES VELÁZQUEZ
DIRECTORA DE TESIS

DRA. ESTHER ALBARRÁN RODRÍGUEZ
DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN
ASESORES

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco. Julio de 2005



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS

COORDINACIÓN DE POSGRADO



COORDINACIÓN DEL POSGRADO INTERINSTITUCIONAL
EN CIENCIAS PECUARIAS
SEDE UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por este conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrolló el pasante de la Maestría en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, **M.V.Z. Ernesto de Lucas Palacios**, cuyo título es:

Efecto de adsorbentes (Clinoptilolita y manano oligosacáridos) en raciones de pollo de engorda contaminadas con fumonisinas

Trabajo dirigido por: **Dra. Waldina Patricia Reyes Velazquez**

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 04 Julio del 2005

REVISOR
Dr. Teódulo Quezada Tristán

REVISOR
Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores

REVISOR
Dra. Waldina P Reyes Velazquez

REVISOR
Dra. Esther Albarrán Rodríguez

REVISOR
M en c Gerardo Simón Estrada Michel

c.c.p. Archivo

ABREVIATURAS

AFB ₁	aflatoxina B ₁
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
AFs	aflatoxinas
ALT	alanino aminotrasferasa
AST	Aspartato amino transferasa
CA	consumo de alimento
CADA	Consumo de alimento diario por ave
CE	cáncer esofágico
CUCBA	Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
CV	Coefficiente de variación
dL	Decilitro
DON	deoxinivalenol
EA	eficiencia alimentaria
EPP	Edema pulmonar porcino
FA ₁	fumonisina A ₁
FA ₂	fumonisina A ₂
FA ₃	fumonisina A ₃
FB ₁	fumonisina B ₁
FB ₂	fumonisina B ₂
FB ₃	fumonisina B ₃
FBs	fumonisinas
FC ₁	fumonisina C ₁
FC ₂	fumonisina C ₂
FC ₃	fumonisina C ₃
FC ₄	fumonisina C ₄
g	gramo
GDP	ganancia de peso diaria
GSH	glutación
HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
IC	índice de conversión
IE	índice de eficiencia
IP	índice de productividad
Kg	kilogramo
L	Litro
LEME	Leucoencefalomalacia equina
M	Molar
Mcal	Megacalorías
meq	Miliequivalente
mg	miligramos
mL	mililitro
ng	nanogramos
nm	nanómetros
OA	ocratoxina

°C	grados centígrados
p.v	Peso vivo
PBS	solución buffer de fosfatos
PCSC	pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PD	punto de desenvolvimiento
PP	Peso promedio
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
RE	Retículo endoplasmático
rpm	revoluciones por minuto
SA	esfinganina
SO	esfingosina
U/L	Unidades por litro
µg	microgramos
µL	microlitros
µm	micras
µmol	Micromol
ZEA	zearalenona

CONTENIDO

Agradecimientos	i
Lista de Tablas	ii
Lista de Figuras	iii
Resumen	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Impacto de la producción Avícola en México	1
I.2. Contaminación del alimento por hongos y micotoxinas	2
I.3. Prevención y control de micotoxinas	4
I.3.1. Métodos de eliminación de micotoxinas en productos agrícolas ..	5
I.3.2. Uso de sustancias adsorbentes	7
I.3.2.1. Aluminosilicatos	7
I.3.2.2. Bentonitas sódicas	9
I.3.2.3. Zeolitas	9
I.3.2.3.1. Clinoptilolita	10
I.3.2.4. Manano oligosacáridos	11
I.4. Fumonisinias: generalidades e importancia.....	12
I.4.1. Mecanismo de acción de las fumonisinias	14
I.4.2. Biomarcadores de exposición a fumonisinias	17
I.4.3. Efectos de las fumonisinias en aves	21
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
III. JUSTIFICACIÓN	24
IV. HIPÓTESIS	25
V. OBJETIVOS	26
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	27
6.1. Etapa I. Determinación “ <i>in vitro</i> ” del nivel de inclusión de la clinoptilolita	27
6.2. Etapa II. Evaluación del uso de adsorbentes	28
6.2.1. Producción de fumonisinias a partir de una cepa de <i>Fusarium verticillioides</i>	28
6.2.1.1. Extracción y detección de fumonisinias por cromatografía de líquidos (HPLC)	28
6.2.2. Prueba experimental en pollos	29
6.2.2.1. Técnica para la determinación de AST en suero	32
6.2.2.2. Técnica para la determinación de ALT en suero	32
6.2.2.3. Técnica para la determinación de proteínas totales en suero	33

6.2.2.4. Técnica para la determinación de los niveles de SA y SO en suero	33
6.2.2.5. Técnica para la determinación de proteínas en tejidos	34
6.2.2.6. Técnica para la determinación de GSH en tejidos ...	34
6.2.2.7. Peso de órganos	34
6.2.2.8. Estudio Histopatológico	35
6.3. Análisis Estadístico	35
VII. RESULTADOS	36
7.1. Determinación “in vitro” del nivel de inclusión de la clinoptilolita	36
7.2. Contaminación natural por micotoxinas en las dietas	36
7.3. Parámetros productivos	37
7.4. Determinación de los niveles de AST, ALT y proteínas totales en suero de pollo	38
7.5. Relación SA/SO en suero de pollos	40
7.6. Proteínas en hígado y riñón	41
7.7. Glutation reducido (GSH) en tejidos de hígado y riñón	42
7.8. Peso de órganos	44
7.9. Estudio histopatológico	46
VIII. DISCUSIÓN	52
8.1. Determinación “in vitro” del nivel de inclusión de la clinoptilolita	52
8.2. Evaluación del uso de adsorbentes	53
8.2.1. Contaminación natural por micotoxinas en las dietas	53
8.2.2. Efectos en parámetros productivos	54
8.2.3. Actividad enzimática de AST, ALT y niveles de proteínas totales en suero	55
8.2.4. Relación SA/SO en suero de pollos	56
8.2.5. Proteínas y glutacion en hígado y riñón	58
8.2.6. Efecto de las fumonisinas sobre órganos	60
8.2.7. Estudio Histopatológico	61
IX. CONCLUSIONES	64
X. BIBLIOGRAFÍA	65

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre, por todo lo que me ha dado.
A mis hijos, por ser un motivo para superarme.
A mi hermana, por su comprensión y paciencia.
A mi sobrino, por su apoyo.

A la Universidad de Guadalajara, al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, al Departamento de Clínica Veterinaria del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por el apoyo brindado para la realización de un nuevo objetivo en mi vida profesional.

A mi Directora de Tesis, Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez, por su apoyo incondicional, confianza, enseñanza, orientación y consejo que me permitió iniciarme en el campo de la investigación.

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

A la Dra. Esther Albarrán Rodríguez, por sus consejos y colaboración en los estudios histopatológicos.

Al Dr. Teódulo Quezada Tristán, por su orientación, tiempo y la ayuda que me brindo en todo momento.

Al Dr. Arturo Valdivia Flores, por su ayuda y colaboración en la evaluación de esta tesis.

A la Dra. María Marta Reynoso, por sus comentarios y sugerencias para enriquecer este trabajo.

A mis compañeros de Generación, Lourdes, Alejandro, Guadalupe y Oscar, por su amistad y compañerismo.

A los alumnos del Laboratorio de Micotoxicología, que colaboraron en la realización de la parte experimental de la tesis: Claudia, Marichuy, Paty, Mónica, Jenny y Nancy. A la M.C. Patricia Landeros, por su ayuda en todo momento. Sin ustedes no hubiese sido posible finalizar la tesis.

LISTA DE TABLAS

Tabla No.		Página
1	Propiedades físico – químicas de la clinoptilolita.....	10
2	Concentraciones de SA y SO libres y la relación SA/SO en nm/mL por gramo de tejido o por mL de suero en animales alimentados con dietas contaminadas con FBs.....	19
3	Diseño experimental para la evaluación del efecto del consumo de alimento contaminado con fumonisinas y el uso de adsorbentes.....	30
4	Raciones preparadas para los diferentes tratamientos (Kg/100 Kg) en la prueba experimental en pollo de engorda.....	31
5	Niveles de micotoxinas en las dietas experimentales para pollos de engorda	36
6	Niveles promedio de los parámetros productivos al término de la prueba experimental con los pollos de engorda.....	39
7	Actividades enzimáticas promedio de AST, ALT y proteínas totales en suero de pollos al día 7 y 21 post-exposición a fumonisinas.....	40
8	Niveles de SA y SO y relación SA/SO determinados en suero sanguíneo de pollos al día 7 y 21 post-exposición a fumonisinas.....	41
9	Valores de proteínas (mg/100mg de tejido) en hígado y riñón de pollo al día 7 y 21 post-exposición a fumonisinas.....	42
10	Niveles de glutatión reducido (µg/g de tejido) en hígado y riñón de pollos a día 7 y 21 post-exposición a fumonisinas.....	43
11	Peso promedio de órganos a los 7 días post-exposición a fumonisinas en pollos de engorda.....	44
12	Peso promedio de órganos a los 21 días post-exposición a fumonisinas de los pollos de engorda.....	45
13	Histopatológicos de hígado y riñón al día 7 post-exposición a fumonisinas en los pollos de engorda.....	47
14	Histopatológicos a los 21 días post-exposición a fumonisinas en hígado y riñón de pollo de engorda.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Estructura química de FB ₁	13
2	Biosíntesis "de novo" de los esfingolípidos complejos	15
3	Inhibición del metabolismo de los esfingolípidos complejos por FB ₁	16
4	Fotomicrografía de hígado de pollo del grupo control, se observa el tejido con citóarquitectura normal, grupos irregulares de hepatocitos (ce), espacios sinusoidales (flechas) y vena centrolobulillar (vc). Objetivo 20X, tinción HE	48
5	Fotomicrografía de hígado de pollo del grupo fumonisinas 100 ppm, se observa necrosis celular, evidente por picnosis (p) y degeneración de hepatocitos (d). Objetivo 20X, tinción HE	48
6	Fotomicrografía de tejido renal de pollo del grupo control donde se observa la estructura normal, glomérulo (gl) con espacio definido, así como cortes transversales de diversos tubulos(t) con células epiteliales normales. Objetivo 20X, tinción HE	50
7	Fotomicrografía de riñón de pollo del grupo Fumonisinias 100 ppm. Se observa necrosis celular (n), picnosis (p) y tumefacción glomerular (tg). Objetivo 20X, tinción HE	50

RESUMEN

Las fumonisinas (FBs), producidas por *Fusarium verticillioides*, han sido reconocidas como una importante micotoxina que causa riesgos en la salud tanto de humanos como animales. En los últimos años se han propuesto estrategias para la reducción de las micotoxicosis, entre estas se encuentran la utilización de adsorbentes de micotoxinas. Con el propósito de evaluar la eficiencia de dos adsorbentes (clinoptilolita y manano oligosacáridos extraídos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*) en dietas de pollo de engorda contaminadas experimentalmente con 75 y 100 mg/Kg de fumonisina B₁ (FB₁) se seleccionaron 162 pollos de engorda Ross machos, de 44 ± 1.2 g peso promedio, distribuidos aleatoriamente en 9 tratamientos que incluyeron los dos niveles de FB₁ con y sin adsorbentes. Se evaluaron los parámetros productivos y se determinó la actividad enzimática de AST, ALT; proteínas totales, esfinganina (SA) y esfingosina (SO) en suero; proteínas totales y glutatión reducido (GSH) en tejido hepático y renal, pesos de hígado, corazón, bazo, riñón y bolsa de Fabricio, además se realizó un estudio histopatológico. Los resultados se compararon mediante ANOVA utilizando el paquete estadístico SAS (1996) y se aplicó la prueba de Tukey para comparación de medias. Los tratamientos no mostraron diferencia estadística en los parámetros productivos. Se observó aumento significativo de la actividad enzimática de AST y en la relación SA/SO en los grupos expuestos a FB₁. Los niveles de glutatión reducido determinados en hígado presentaron aumento significativo ($p < 0.05$) en el tratamiento que contenía 100 mg/Kg de FB₁. Respecto al peso de los órganos, todos los tratamientos fueron estadísticamente similares al grupo control excepto riñón y corazón en los niveles de 75 mg/Kg de FB₁. El estudio histopatológico mostró daño tisular moderado. Se puede concluir que los niveles evaluados de fumonisinas inician el daño a nivel celular detectado por la alteración de la relación SA/SO, sin que se aprecien efectos toxicológicos severos en órganos, por lo que se consideró a la relación como un biomarcador sensible de exposición a FB₁ en pollos de engorda. Además se observó un mejor efecto protector por el uso de los manano oligosacáridos en las dietas contaminadas con FB₁.

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. Impacto de la producción Avícola en México

La importancia del sector avícola en México radica en el papel estratégico que juega en la nutrición de la población humana. A nivel mundial es el cuarto productor de pollo y el sexto en huevo. La producción de carne de pollo en México en el 2003, fue de 2'268,589 toneladas con un valor de 28,901 millones de pesos en promedio anual, además el consumo per cápita de carne de pollo ha aumentado de 15.7 Kg/año en 1995 a 22.4 Kg/año en el 2003 (Unión Nacional de Avicultores, 2003).

En la actualidad la Avicultura ha experimentado un notable desarrollo en la producción de carne de pollo. El incremento se debe principalmente a los avances que han ocurrido en materia de genética y nutrición, así como a la creación de nuevos sistemas de manejo en la crianza y producción de aves.

En los años 90 bajo condiciones normales de manejo una granja permitía obtener pollos de engorda de 2 Kg de peso vivo, alcanzado en 46 días, con una conversión alimenticia de 2.1, mientras que en la actualidad el peso del pollo es de 2.3 Kg a los 41 días con una conversión menor a 1.9 (Austic y Nesheim, 1990). Naturalmente todo esto ha traído importantes cambios en las estructuras del sector avícola en México, desde el tamaño de las granjas, hasta la calidad de sus equipamientos. Esto conlleva a nuevos retos, tanto en lo referente a los animales, como en la competitividad existente en el sector, en cuanto a la calidad con que se requiere presentar el producto final al consumidor.

Estos nuevos objetivos están exigiendo a todo el sector avícola la aplicación de un sistema de seguimiento y trazabilidad, que permita rastrear el origen de todo alimento a través de su cadena productiva, no siendo el pollo de engorda una excepción.

Gran parte de las raciones avícolas, comúnmente consideradas como alimentos balanceados, se formulan en la actualidad a base de cereales, e incluyen todos los nutrientes necesarios para

una alimentación óptima. Las raciones para aves de corral se elaboran en forma de harinas, migajas y pellets. En las harinas, muchos de los ingredientes como los cereales deben molerse perfectamente antes de agregarse a la ración, de modo que cada porción de alimento contenga los requerimientos mínimos necesarios, para garantizar un buen crecimiento. En el caso de los pellets, la mezcla alimenticia debe comprimirse con un equipo especializado para formar partículas pequeñas (North y Bell, 1993).

La alimentación es uno de los aspectos de mayor impacto en las explotaciones pecuarias, ya que representa del 70 al 80% de los costos de producción, y es el vehículo de numerosos trastornos a la salud de las aves, por lo que deben plantearse estrategias que permitan asegurar la calidad nutricional y la inocuidad del alimento a fin de optimizar el aprovechamiento de los nutrientes y la obtención de animales de alta calidad para consumo humano.

I. 2. Contaminación del alimento por hongos y micotoxinas

El manejo inapropiado de los cultivos a cosecha causa pérdidas significativas en la cantidad y calidad; las pérdidas pos-cosecha oscilan entre un 9% en los Estados Unidos y 50% en algunos países en desarrollo (Pimentel, 1991). Muchas de las pérdidas son consecuencia de la invasión de los granos por hongos.

Dentro de la comunidad fúngica, las especies del género *Fusarium* son de especial interés económico ya que el hábitat y los nichos ecológicos que ocupan dichas especies están íntimamente vinculadas a la patología vegetal, al deterioro de los alimentos y a la producción de micotoxinas en los mismos (Bradford, 1989). *Fusarium verticillioides* es la especie de mayor prevalencia en el maíz, se conoce que la contaminación ocurre durante los primeros estadios de desarrollo del grano (Chulze y col., 1996).

Entre los hongos asociados al cultivo de maíz se encuentran aquellos que ocasionan daños durante la primera etapa del cultivo infectando semillas y plántulas, como por ejemplo *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. graminearum* Schwabe, *Penicillium oxalicum* Currie and Tom, entre otros. La podredumbre de la semilla es causada por especies del género *Phythium* y los tizones de las plántulas son causadas por *Aspergillus spp.*, *Nigrospora oryzae* (Berk and

Br) Petch. Otros hongos ocasionan daños durante el desarrollo del cultivo, atacando a distintos órganos de la planta, como por ejemplo la podredumbre del pie causada por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. subglutinans* (Wollenw. and Reinking) Nelson, *Diplodia maydis* (Berk) Sacc., la roya provocada por *Puccinia sorghi* (Schw), la podredumbre de la espiga ocasionada por *Gibberella zae* (Schw) Petch, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg y *Aspergillus flavus* Link.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de origen fúngico que poseen diversas estructuras químicas, biológicamente activos, que pueden causar problemas de intoxicaciones agudas, subagudas y crónicas con efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos, entre otros. Son sintetizados por diferentes vías a partir de uno o más metabolitos provenientes del metabolismo primario. En la naturaleza hay una variación enorme en el metabolismo secundario; que puede ser intergenérica, intraespecífica y aún entre cepas de una misma especie (Campbell, 1984).

En los granos cosechados, los hongos provenientes del campo son gradualmente sucedidos por los hongos típicos del almacenamiento (Abramson y col., 1990). La presencia de determinadas especies, la dominancia relativa de algunas y la producción de los metabolitos secundarios varían de acuerdo al estado de desarrollo del grano. Se presentan diferencias en la microflora de los granos de cereales de acuerdo a las zonas geográficas y climas considerados. Sin embargo, el patrón general de colonización es similar para todos los granos. Muchas de las especies encontradas, en maíz, sorgo, arroz y otros cereales en climas tropicales, son las mismas que las aisladas en regiones templadas, en general, se aísla gran variedad de especies de *Aspergillus*, mientras que las de *Penicillium* son reducidas (Pelhate, 1988).

El impacto de las micotoxinas en la salud humana y animal es actualmente reconocido y se estima que causan graves pérdidas económicas estimadas en millones de dólares en todo el mundo (Van Egmond, 1995; Peraica y col., 1999). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación estima que, cada año, el 25% de la producción agrícola destinada a alimentos es afectada por las micotoxinas.

Ello se traduce en un aumento de los costos para los productores de granos; en menor rendimiento, valor nutritivo e incremento en los costos de transporte; para los ganaderos, menor rendimiento de los animales, problemas en la reproducción, aumento en la incidencia de enfermedades, gasto en personal veterinario, aumento en los costos de descontaminación y pérdida en los mercados; para los distribuidores, incremento en los costos de procesos tales como secado, destoxificación y capacidad de almacenamiento; y para los industriales: pérdida de producto, costos de supervisión y análisis de micotoxinas en los productos (Postupolki y col. 1999; Osweiler, 2000; Hussein y Brasel, 2001).

En las explotaciones pecuarias las pérdidas económicas son importantes debido al efecto subclínico de las micotoxinas en los animales, los cuales se manifiestan especialmente sobre los parámetros productivos como son el consumo de alimento, la ganancia de peso y la conversión alimenticia, entre otros. Las principales micotoxinas involucradas en la alimentación de aves son aflatoxinas (AFs), ocratoxinas (OA), deoxinivalenol (DON), toxina T-2 y las fumonisinas (FBs), estas últimas caracterizadas en 1988 por Bezuidenhout y col.

I.3. Prevención y control de micotoxinas

La estrategia más efectiva de controlar la contaminación con micotoxinas es la prevención tanto de la infección fúngica como en la producción de sus toxinas, a campo y durante el almacenamiento. Cuando la contaminación ha tenido lugar, existe la posibilidad de reducir los niveles de toxinas iniciales por debajo de los valores de tolerancia recomendados a través de la dilución de los granos contaminados o la implementación de estrategias de descontaminación (Charmley y col., 1995; Galvano y col., 2001).

Desde hace varios años, se han establecido límites regulatorios para las toxinas más peligrosas, AFs en cereales, oleaginosas y productos derivados destinados principalmente al consumo humano. En la actualidad se cuenta con numerosos datos que informan la co-ocurrencia de varias micotoxinas en los alimentos: AFB₁ y FB₁; OA y AFB₁; citrinina, DON, ácido penicílico y toxina T-2; AFs y ácido ciclopiazónico; AFB₁ y DON; AFB₁ y toxina T-2 (FAO, 1997).

La presencia de múltiples toxinas en los alimentos debe ser considerada cuando se aplican estrategias de descontaminación. Un proceso se considera efectivo cuando cumple los siguientes requisitos: ser aceptado por las agencias regulatorias, ser económico, aplicable a gran escala y capaz de reducir el riesgo de exposición a un alimento contaminado con más de una toxina fúngica.

Debido a que los conocimientos sobre la importancia sanitaria y económica de la contaminación por micotoxinas de los alimentos, son relativamente recientes y que los estudios de toxicología crónica son muy prolongados, no existen métodos industriales de gran difusión tendientes a prevenir las micotoxicosis. La diversidad de estructuras químicas de las micotoxinas de mayor incidencia hace que las posibles soluciones industriales deban apoyarse en los siguientes aspectos:

- Aplicación de métodos rápidos de detección.
- Incorporación de equipos de descontaminación, al diseño de las pequeñas plantas productoras de alimentos que permitan tratar cantidades moderadas de productos contaminados.
- Utilización de aditivos, que puedan incorporarse en forma sistémica en la producción de alimentos.

La industrialización de soluciones que permitan utilizar productos una vez descontaminados, constituirá sin duda, un importante beneficio sanitario y económico en la sociedad que necesita cada vez más aprovechar todos los recursos alimentarios garantizando la ausencia de contaminantes tóxicos.

I.3.1. Métodos de eliminación de micotoxinas en productos agrícolas

Los métodos de descontaminación de micotoxinas en productos agrícolas se pueden dividir en tres categorías: químicos, biológicos y físicos, (Charmley y Prelusky, 1994; Galvano y col., 2001).

Numerosos métodos químicos han sido propuestos para la destrucción o inactivación de las micotoxinas en insumos agrícolas contaminados naturalmente. Se han ensayado diversos productos químicos para lograr la detoxificación de estos insumos. Sin embargo, la mayoría de estos métodos no satisfacen los criterios de aceptabilidad citados previamente; debido a que si bien destruyen a las AFs, también disminuyen el valor nutricional del producto o producen metabolitos residuales tóxicos (Basappa y Shantha, 1996).

Entre los métodos biológicos, la detoxificación microbiana es una alternativa para la reducción de los niveles de micotoxinas. Su efectividad se fundamenta en la presencia de un microorganismo controlador o la acción de compuestos químicos específicos producidos por éste, que inhiben el crecimiento del hongo productor o directamente la producción de sus toxinas.

El biocontrol para FBs se ha realizado con especies de bacterias productoras de sustancias con actividad fungicida sobre especies de *Fusarium*. Cavaglieri y col. (1997) mostraron que la cepa de *Bacillus subtilis* inhibió el crecimiento de *F. verticillioides* en medio de cultivo y redujo la producción de FB₁.

En la utilización de microorganismos o sus metabolitos específicos, como probióticos para la detoxificación de alimentos contaminados con micotoxinas, es necesario profundizar sobre el efecto y la toxicidad de todos los metabolitos que producen éstos microorganismos, así como su posible patogenicidad.

Los métodos físicos de detoxificación desarrollados son: la limpieza, la separación mecánica, el lavado, la segregación por densidad, la inactivación térmica, la irradiación, el ultrasonido, la extracción con solventes y la adsorción. La mayoría de éstos métodos se usan para remover a las aflatoxinas de los productos agrícolas, tales como cacahuete y alimentos para animales (Jackson y Bullerman, 1999; López- García y Park, 1998; Sinha, 1998).

I.3.2. Uso de sustancias adsorbentes

Los procesos utilizados en la elaboración de alimentos para animales generalmente no producen disminución en los niveles de las micotoxinas. El peleteado del alimento disminuye los niveles de AFs, pero no los de DON. El proceso de ensilado del maíz no destruye las AFs, zearalenona (ZEA), DON y OA (Scott, 1997).

Uno de los métodos más recientes propuestos para la prevención de las micotoxicosis, consiste en el uso de sustancias inertes, que se adicionan a los alimentos para animales durante el proceso de elaboración. Estas sustancias actúan posteriormente secuestrando las toxinas en el tracto gastrointestinal y reduciendo la biodisponibilidad de las mismas (Nahm, 1995).

En el mercado existen varias clases de adsorbentes y dentro de las mismas existen diferentes cualidades. El secuestro de micotoxinas por materiales adsorbentes depende de las propiedades fisicoquímicas del material adsorbente y del adsorbato (molécula que se pretende atrapar).

De una manera general, los adsorbentes pueden ser divididos en dos grandes grupos: los aluminosilicatos y los adsorbentes con principio orgánico, en este último se tienen a los adsorbentes con enzimas, los productos derivados de levaduras y los organoaluminosilicatos. Una gran variedad de materiales adsorbentes, tales como, carbón activado, bentonitas, aluminosilicatos de sodio y calcio hidratado (HSCAS), zeolitas (clínoptilolita); otras variedades de arcillas, resinas sintéticas de intercambio iónico, como colestiramina y sustancias poliméricas como, polivinil-polipirrolidona han sido evaluados exitosamente en la adsorción de numerosas micotoxinas (Galvano y col., 1997, 1998; Huwig y col., 2001; Piva y col., 1995; Ramos y Hernández, 1997; Scott, 1998).

I.3.2.1. Aluminosilicatos

La utilización de los aluminosilicatos para la adsorción de micotoxinas ha sido estudiada por más de 20 años (Davidson y col., 1987; Masinmango y col., 1978; Ramos y Hernández,

1997). Ciertos aluminosilicatos han mostrado capacidad para unir AFs en aceite de cacahuate y alimentos para animales (Machen y col., 1988). Sin embargo los efectos a largo plazo y la seguridad de los aluminosilicatos no han sido determinados. Es importante destacar, que no existe en la literatura suficiente evidencia de que estas sustancias adsorbentes disminuyan significativamente el valor nutricional de las raciones, mediante el secuestro de vitaminas, aminoácidos y minerales esenciales (Ledoux y col., 1999). Sin embargo, algunos estudios demuestran lo contrario y esto podría provocar algún trastorno en el comportamiento productivo de las aves (Phillips y col., 1988, Ramos y Hernández, 1997).

Los aluminosilicatos multilaminares poseen la capacidad de adsorber agua y ciertas moléculas hidrosolubles en el espacio interlaminar, produciendo la expansión de la arcilla. Esta característica hace que estos materiales posean una importante capacidad de adsorción y escasa selectividad. Estas arcillas, contienen en su estructura canales conocidos como tamices moleculares, los cuales contienen agua y cationes alcalinos de compensación e intercambio. Cuando estos canales están libres de agua, sus propiedades aumentan. Además de las características topológicas, otras características morfológicas que se tienen en cuenta para caracterizar a estos adsorbentes son: el área superficial, la habilidad para expandirse por adsorción de agua, la capacidad de intercambio catiónico, el diámetro y el volumen de poro, la catálisis de superficie y el adsorbato (Phillips y col., 1995).

Estos y otros tipos de arcillas han sido utilizados con diferentes propósitos en la agricultura y la industria durante muchos años. Los primeros informes sobre el uso del HSCAS para adsorber AFs datan del año 1987. Phillips y col. (1988) reportaron brevemente el descubrimiento de las propiedades adsorbentes de este filosilicato bajo condiciones *in vitro* y postularon su uso como agente secuestrante en el tracto gastrointestinal de los animales. Al mismo tiempo; Davidson y col. (1987) informaron que el uso de este adsorbente al 0.1 y 0.5% en la ración de las aves contaminada con AFs (20 a 80 mg/Kg) era capaz de disminuir la biodisponibilidad de estas toxinas de un modo dependiente de la dosis.

Los estudios *in vitro*, demostraron que el HSCAS, posee una gran capacidad para adsorber AFB₁, formando un complejo estable en agua a pH 2, 7 y 10 a temperaturas de 25 y 37° C. La

estabilidad del complejo HSCAS- AFB₁ fue demostrada al tratarlo con una serie elutrópica de solventes y lograr recuperar sólo un 10% de toxina (Phillips y col., 1995).

I.3.2.2. Bentonitas sódicas

Las bentonitas sódicas, comúnmente utilizadas en la industria como un agente aglutinante en la elaboración de alimentos peleteados, pueden adsorber AFB₁ contenida en los insumos para bovinos y disminuir los niveles de aflatoxina M₁ (AFM₁) en leche (Ramos y col., 1996). En aves, la adición de estas bentonitas al 0,4% ha demostrado disminución de los efectos inmunodepresores causados por el consumo de alimentos contaminados con AFBs (Ibrahim y col., 2000).

I.3.2.3. Zeolitas

Las zeolitas son minerales de origen volcánico que comprenden un grupo de más de 40 aluminosilicatos, entre los cuales, los más importantes por la consecutividad de sus apariciones, la dimensión de sus depósitos y la diversidad de aplicaciones son a escala mundial, la clinoptilolita y la mordenita (Mumpton y Fishmann, 1977).

Son estructuras porosas, de alta cristalinidad, naturales o sintéticas que presentan características estructurales comunes (Oguz y Kurtoglu, 2000; Oguz y col., 2000; Parlat y col., 1999). Las zeolitas son tectosilicatos, constituidos por unidades fundamentales, formadas por la combinación tridimensional de tetraedros de SiO₄ y de AlO₄ unidos entre sí a través de átomos de oxígenos comunes para formar una estructura tridimensional aniónica.

Las propiedades y aplicaciones de las zeolitas naturales que se han tenido en cuenta para mejorar la utilización de los nutrientes, así como los efectos terapéuticos relacionados con el control de problemas entéricos, fueron los siguientes:

- Su capacidad de intercambio iónico
- Astringente
- Prevención y curación de enfermedades de los órganos digestivos

- Aumento de la tasa de crecimiento
- Incremento de la eficiencia de utilización de nutrientes
- Control de los olores indeseables en las instalaciones avícolas y pecuarias
- Prevención de la contaminación y desarrollo de hongos durante el almacenaje de piensos
- Regulación del consumo voluntario de alimentos (Mumpton y Fishmann, 1977).

I.3.2.3.1. Clinoptilolita

La clinoptilolita, zeolita del grupo de los tectosilicatos, es de origen natural y se caracteriza por su estructura externa hexagonal y la interna formada por un tetraedro de silicio, oxígeno y aluminio, sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físico – químicas de la clinoptilolita

Propiedades químicas:		Propiedades físicas:	
SiO ₂	65%	Densidad específica	2.00 grs/cm ³
Al ₂ O ₃	12%	Densidad aparente	1.00 grs/cm ³
Fe ₂ O ₃	2%	Color	Gris verdoso
CaO	4%	Estabilidad térmica	560 ° C
MgO	2%	Punto de fusión	982 ° C
K ₂ O	2%	Conductividad	7
Na ₂ O	1%	Estabilidad alcalina	7-11 pH
	Grado de pureza	Estabilidad ácida	2-7 pH
Clinoptilolita	85%		
Calcio- sodio	5%	Capacidad de Intercambio iónico	150 meq/100 g
Feldespatho	1%	Volumen de poro	0.34 cm ³ /cm ³
Montmorilonita	4%	Granulometría	0 - 1 mm

La clinoptilolita se ha utilizado en dietas de aves y cerdos por su capacidad en la retención de iones de amoníaco (NH_4^+) a nivel digestivo (Castro y Low, 1991). Existen otros estudios con clinoptilolitas como promotores de la función digestiva con un desarrollo mayor de la flora ruminal. Existiendo a la fecha escasos reportes sobre su uso como adsorbentes de micotoxinas, en particular de FBs.

La falta de buenos resultados por el uso de algunos adsorbentes para enfrentar otras micotoxinas diferentes de las AFs, trajo como consecuencia la aparición en el mercado de los productos con principios orgánico. Dado que las micotoxinas menos polares no son adsorbidas por la superficie hidrofílica se investigó la posibilidad de utilizar adsorbentes con fracciones orgánicas que permitan modificar la polaridad de la superficie, con el advenimiento de la biotecnología se han aplicado principios específicos de acción a través de enzimas o microorganismos basados en levaduras o pared celular de ellas (Stanley y col., 1993).

I.3.2.4. Manano oligosacáridos

Los manano oligosacáridos, son carbohidratos funcionales extraídos de la porción interior de la pared celular de levadura, es una alternativa a las arcillas y otras estrategias dirigidas a proteger a las aves de los efectos adversos de los alimentos contaminados con micotoxinas. El efecto neutralizante de micotoxinas de los manano oligosacáridos se remonta a 1993, cuando el Dr Victor Stanley de Priré reportó que un cultivo de levaduras vivas (Yea- Sacc 1026) redujo los efectos adversos de la AFs en pollo de engorda. Cuando se suministró alimento con 5 ppm de AF a los pollos, el peso vivo disminuyó en 9.9% comparado con los controles (506 vs 456 g), sin embargo, cuando la levadura fue incorporada se restablecieron los parámetros productivos, así como la disminución de la albúmina sérica y los efectos asociados con las AFs sobre el hígado, páncreas y corazón (Stanley y col., 1993).

Las paredes celulares del *Saccharomyces cerevisiae* (PCSC), representan entre el 15 y 25 % de materia seca, el 80 a 85% son polisacáridos, principalmente glucosa y manosa y, 10 a 15% son proteínas. El resto de la pared está compuesto en proporción mínima de lípidos y de fosfatos inorgánicos (Joseleau y col., 1999). Los componentes β -glucanos, obtenidos a partir

de las PCSC, son ahora reconocidos como inmunoestimulantes (Bohn, 1995) y ejercen una acción sinérgica con los antibióticos contra infecciones bacterianas de tubo digestivo (Lahnborg y col., 1982). No han sido muchos los trabajos realizados en aves, con la adición de *S. cerevisiae*, la gran mayoría se han realizado en otras especies y en menor proporción con las paredes celulares. Masse y Weiser (1994) evaluaron la adición en el alimento de levaduras vivas de *S. cerevisiae*, con niveles bajos de vitamina B6 (piridoxina), no encontrando diferencias en el peso corporal y síntomas neurológicos en pollo de engorda.

Trabajos más recientes fueron realizados por Onifade y col (1999), quienes evaluaron la suplementación de *S. cerevisiae* como sustituto de un antibiótico para pollos de engorda, encontrando incremento en la ganancia de peso y reducción de la grasa abdominal, por lo que concluyen que *S. cerevisiae* puede ser un sustituto natural de los antibióticos como promotores de crecimiento. Posteriormente, Santín y col, (1999), evaluaron las paredes celulares de *S. cerevisiae* sobre la respuesta inmune, encontrando la posibilidad de tener un efecto importante en la respuesta con vacuna de la enfermedad de Newcastle.

Spring y col. (2000), estudiaron la adición de manano oligosacaridos (pared celular de *S. cerevisiae*), sobre las concentraciones de bacterias entéricas en pollo de engorda de 3 días de edad, demostrando que el número de coliformes, fue numéricamente más bajo cuando se adicionaba la levadura.

I.4. Fumonisinias: generalidades e importancia

Las FBs constituyen una familia de micotoxinas producidas principalmente por dos especies de la sección *Liseola*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Dichas especies son las de mayor importancia e contaminan con gran frecuencia los cultivos de maíz en todo el mundo (Marasas y col., 1984; Nelson, 1992; Ross y col., 1990). Otras especies relacionadas: *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. anthophilum* y *F. dlamini* son consideradas productoras de estas toxinas (Nelson y col., 1992). Existe alta incidencia de la especie *F. verticillioides* en maíz en campo y almacenado, dado que, este cereal constituye el 80% de la composición de los alimentos

balanceados para aves, esto trae implicado un problema de toxicidad potencial en la producción avícola (Avila, 1990).

Hasta el momento se han aislado y purificado diez tipos de FBs, denominadas fumonisinas A₁ (FA₁), A₂ (FA₂), B₁ (FB₁), B₂ (FB₂), B₃ (FB₃), B₄ (FB₄), C₁ (FC₁), C₂ (FC₂), C₃ (FC₃), C₄ (FC₄). Las FBs correspondientes a la serie B y C son contaminantes naturales en alimentos a base de maíz para consumo humano y animal (Pittet, 1998). Mientras que las de la serie A, son formadas únicamente durante el proceso de purificación (Plattner y col., 1992; Seo y Lee, 1999). Estructuralmente las FBs están formadas por una cadena lineal hidrocarbonada de 20 átomos de carbono sustituidos en el C-2 por una amina, los C-3 y C-5 por hidroxilos, C-12 y C-16 por grupos metilo, C-14 y C-15 por radicales hidroxilos y en el C-10 el radical que sustituye varía según el tipo de fumonisina (Figura 1).

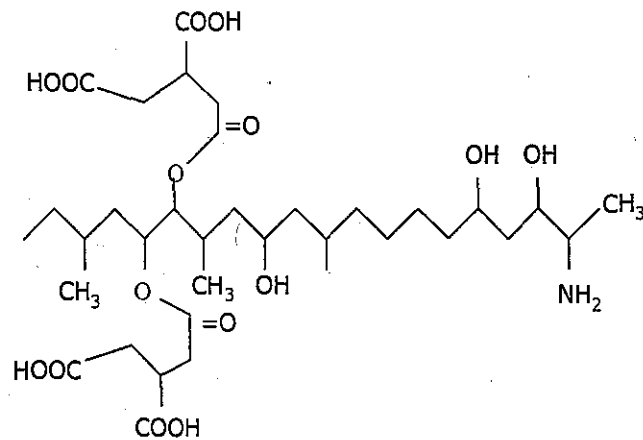


Figura 1. Estructura química de FB₁ (Shier y col., 1995).

Las FBs son claramente la causa de varias enfermedades en animales (Ross y col., 1992). Estas toxinas están asociadas con la leucoencefalomalacia equina (LEME) y el síndrome de edema pulmonar porcino (EPP) (Colvin y Harrison, 1992), actividad inmunosupresora en aves de corral (Oswald y Comera, 1998), cáncer de hígado en ratas (Gerdelblom y col., 1991) y recientemente se le relacionó con un aumento en el riesgo de cáncer de esófago (CE) en humanos, que consumen maíz contaminado (Rheeder y col., 1992; Sydenham y col., 1990).

También FB₂ y FB₃ son promotoras de cáncer con una actividad similar en hígado de ratas (Gelderblom y col., 1992). La Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC) evaluó a las toxinas derivadas de *F. verticillioides* como grupo 2B o posibles carcinógenos en seres humanos (IARC, 1993).

I.4.1. Mecanismo de acción de las fumonisinas

Diferentes mecanismos de acción han sido propuestos para explicar todas o algunas de las enfermedades provocadas por las FBs en animales. Dos de ellos involucran la interrupción en el mecanismo lipídico como un evento molecular inicial. Existen también varios estudios basados en la hipótesis de que las FBs inducen cambios en las enzimas involucradas en el ciclo de regulación, diferenciación y/o apoptosis celular como ciclo de acción inicial o secundario (Lim y col., 1996).

Las FBs son similares en su estructura a SA y SO, bases esfingoides involucradas en la biosíntesis de los complejos ceramida y esfingolípidos. Wang y col. (1991) propusieron, a partir de esta observación, un posible mecanismo de acción de estas micotoxinas a través de la interrupción de la biosíntesis de esfingolípidos.

Las FBs exhiben "*in vitro*" una inhibición tipo competitiva con los sustratos de la enzima ceramida sintetasa (esfinganina y ácidos grasos-CoA). La enzima es responsable de la acilación de esfinganina así como de la reacilación de esfingosina (Merrill y col., 1996). Durante la biosíntesis "*de novo*" de los esfingolípidos, el primer paso enzimático ocurre en el retículo endoplásmico (RE), donde la serina se condensa junto a palmitoil-CoA a través de la enzima serina palmitoiltransferasa para formar 3-cetoesfinganina (Ksa), produciendo por reducción SA. Posteriormente la acilación de SA es realizada por la enzima N-aciltransferasa de esfinganina (cerámida sintasa), que utiliza varios ácidos grasos unidos a CoA. La adición del grupo principal correspondiente (por ejemplo, fosforilcolina, glucosa, galactosa, y cientos de polisacáridos más complejos) ocurre en el aparato de Golgi.

Los eventos que conducen a la adición del doble enlace 4-5 trans presente en las esfingosinas no son claros, aunque se conoce que es posterior a la acilación del grupo amino. Por lo tanto, SO libre no es un intermediario del camino biosintético (Merrill y col., 1991; Rother y col., 1992). El proceso de degradación involucra la hidrólisis (ocurrída en lisosomas, endosomas y membrana plasmática) de los esfingolípidos complejos con la formación de SO, pudiendo ser reacilada o fosforilada (SO-P) y, posteriormente el SO-P es reducido en aldehído graso y fosfato etanolamina. Finalmente, éste es incorporado a fosfatidiletanolamina (PE).

Un significativo aumento de SA (entre otras bases esfingoides de cadena larga) es producido poco después de la exposición de cultivos celulares o animales de experimentación a FBs. Parte es metabolizado por células y el resto es liberado desde tejidos a suero y orina. La reacilación de SO libre también podrá verse bloqueada en presencia de FBs, produciendo un incremento en la concentración de SO libre, aunque menor comparado con el de SA (Riley y col., 1994). A consecuencia de tal exposición, se observa una formación reducida de esfingolípidos complejos y un significativo incremento de la concentración intracelular de SA y de la relación esfinganina/esfingosina ($SA/SO > 1$). La consiguiente acumulación de esfinganina resulta citotóxica e inhibitoria del crecimiento celular (Figuras 2 y 3).

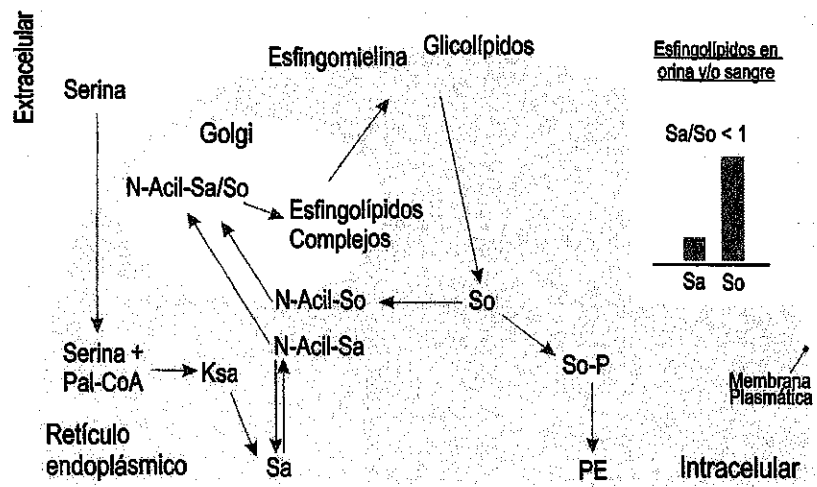


Figura 2. Biosíntesis “de novo” de los esfingolípidos complejos

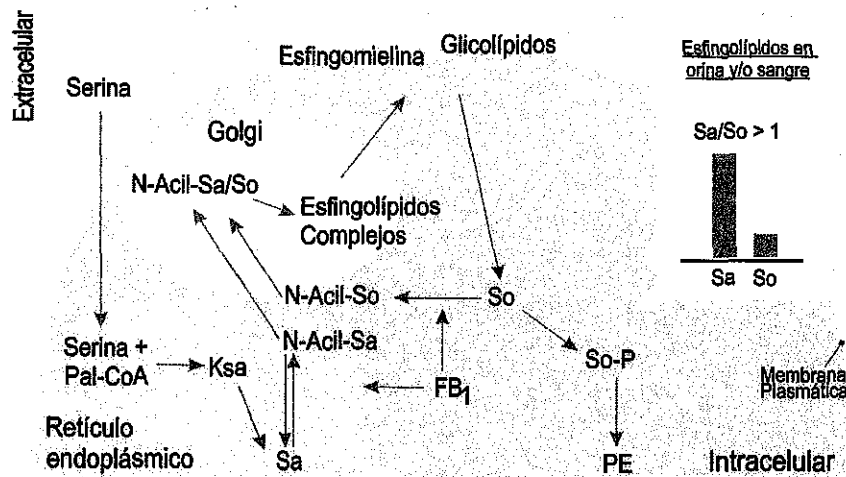


Figura 3. Inhibición del metabolismo de los esfingolípidos complejos por FB₁

Puesto que la presentación de esfingosinas libres en células de mamíferos es siempre producto del catabolismo de esfingolípidos y la presencia de SA libres son intermediarios de la ruta biosintética *de novo* de esfingolípidos, ambos grupos esfingoides se encuentran siempre en concentraciones bajas en células sanas. Por lo que, elevadas concentraciones pueden afectar el crecimiento de las células y dañar su integridad (Merrill y col., 1993; Merrill, 1991), lo que ha sido asociado con defectos genéticos en la biosíntesis de esfingolípidos.

En resumen, hasta ahora se ha demostrado que algunas de las consecuencias de la inhibición de la esfingonina (esfingosina) N-aciltransferasa por las FBs en estos modelos celulares son: a) inhibición de la biosíntesis *de novo* de esfingosina; b) acumulación de esfingonina libre (Wang y col., 1991; Yoo y col., 1992); c) deplesión del complejo esfingolípido (Merrill y col., 1993; Wang y col., 1991); d) incremento de los productos de degradación por el catabolismo de las bases esfingoides (Merrill, 1991; Merrill y col., 1993); e) incremento de productos lipídicos derivados del aumento de productos de degradación de las bases esfingoides (Smith y Merrill, 1993) y f) e incremento de esfingosina libre (Merrill y col., 1993; Yoo y col., 1992) posiblemente por la inhibición de la reacilación de la esfingosina derivada tanto de la dieta o del catabolismo de complejos de esfingolípidos.

Debido que en cultivos celulares la relación de SO libre con SA libre demostró ser un marcador dimensional de la alteración del metabolismo de esfingolípidos por las FBs, se hipotetizó que la alteración en el metabolismo de esfingolípidos en hígado (u otros órganos) de animales que consumen FBs o alimentos contaminados con la micotoxina pudiera ser detectada por el incremento de la relación SA/SO libres en suero. Esta hipótesis fue probada en una serie de estudios utilizando suero y tejidos obtenidos de ponies, cerdos, pollos y ratas. (Wang y col. 1992).

Basados en los estudios realizados en cerdos, se hicieron las siguientes conclusiones: a) la alteración de la biosíntesis de esfingolípidos en hígado, pulmones y riñones ocurre a baja concentraciones de FBs; b) la elevación de esfinganina libre, de la relación de los grupos esfingoides y la depleción del complejo esfingolípido ocurre antes de que se presenten cambios bioquímicos en suero que indican que el daño tisular es elevado; y c) la FB₁ pura y dietas de maíz contaminadas naturalmente con FBs, ambas alteran la biosíntesis de esfingolípidos principalmente en hígado, pulmones y riñones, siendo menor el daño en otros tejidos (cerebro, páncreas, nódulos linfáticos y músculo esquelético) (Haschek y col., 1993).

En ratas Sprague Dawley alimentadas con dietas conteniendo FB₁ pura por 4 semanas se observó una correlación estrecha entre la severidad de los cambios estructurales observados en hígado y riñón y la elevación de esfinganina libre y la relación SA/SO (Riley y col., 1994a). Otros estudios *in vivo* con pollos (Weibking y col., 1993), peces y conejos dosificados intravenosamente con FBs o consumiendo dietas contaminadas mostraron hallazgos similares.

I.4.2. Biomarcadores de exposición a fumonisinas

La mejor forma de medir la exposición a FBs en humanos y animales puede ser realizada mediante el monitoreo biológico de fluidos y tejidos. Esta área de la investigación ha crecido particularmente para FBs, mediante métodos que se han desarrollado para determinar tanto a los componentes de la micotoxina y a los marcadores del efecto biológico. Para las FBs los dos marcadores de exposición que actualmente has sido investigados son: la presencia de la micotoxina en orina y la alteración de la relación SA/SO (Turner y col., 1999). Se considera

que dicha relación en suero, orina y tejidos es un promotor biomarcador de exposición a FBs, basado en las siguientes investigaciones:

- 1) Todos los ponies y cerdos que recibieron alimento suplementado con maíz naturalmente contaminado con FBs; cerdos alimentados con raciones que contenían FB₁ pura, ratas alimentadas con material cultivado con *F. verticillioides* o con FB₁ pura; y pollos que consumieron material cultivado con *F. verticillioides* mostraron elevación de la relación SA/SO;
- 2) La inhibición de la ceramida sintasa en hepatocitos primarios de rata, mostró ser altamente específica;
- 3) La elevación de SA y SO libres en suero de ponies y cerdos se presenta antes que aparezcan otros cambios bioquímicos por el daño celular y antes que se observen los síndromes de leucoencefalomalacia equina y edema pulmonar porcino (Turner y col., 1999).

Hasta el descubrimiento de las FBs, pocos laboratorios analizaban los niveles de SA y SO libres, ya que no se conocía de compuestos que inhibieran la biosíntesis de esfingosina e incrementaran la concentración de esfinganina en animales.

Existe similitud en la relación SA/SO en hígado y riñones de ratas y cerdos y en suero de ratas, cerdos y ponies que reciben dietas con niveles menores de 1 ppm de FBs. La tabla 2 muestra los niveles de SA y SO libres, y la relación SA/SO, presentes en tejidos y suero de ratas, ponies y cerdos que recibieron dietas con niveles menores a 1 ppm de FBs. Aún cuando existe gran variabilidad en la distribución de las cantidades absolutas de las bases esfingoides libres, las concentraciones de SA y SO en los animales control son consistentemente menores que en animales alimentados con FBs.

Tabla 2. Concentraciones de SA y SO libres y la relación SA/SO en nm/mL por gramo de tejido o por mL de suero en animales alimentados con dietas contaminadas con FBs.

Muestra	Ratas			Ponies			Cerdos		
	SA	SO	SA/SO	SA	SO	SA/SO	SA	SO	SA/SO
Suero	0.032	0.094	0.34	0.008	0.037	0.20	0.058	0.35	0.18
Hígado	1.6	5.9	0.28	0.6	2.4	0.25	1.0	4.3	0.22
Riñón	1.4	5.1	0.29	1.1	3.7	0.30	0.61	4.2	0.15
Pulmón		ND			ND		9.7	37.4	0.25

ND: No detectable

No se tiene reportes de otros estudios que hayan medido los cambios que inducen tóxicos en relación con las bases esfingoides en tejidos. Si bien, se ha reportado elevación de las bases esfingoides libres en hígado graso de ratones con el síndrome de Niemann-Pick Tipo C (Goldin y col., 1992), los niveles elevados fueron secuestrados en los lisosomas e inhibieron el transporte intracelular del colesterol. El incremento de las bases esfingoides libres fue atribuido a la presencia de un inhibidor endógeno de la kinasa de esfinganina citosólica. Estos hallazgos cuestionan el hecho, de si otros tóxicos o enfermedades pudieran indirectamente o no específicamente causar elevación de la relación SA/SO.

Existen diversas maneras por las cuales el metabolismo de esfingolípidos pudiera ser alterado por agentes exógenos, sin embargo ninguno de estos inhiben específicamente a la N-aciltransferasa de esfinganina, por lo que la elevación de la concentración de esfinganina y la resultante inhibición de la biosíntesis de esfingosina pudiera no esperarse con estos agentes. Por ejemplo, las lipoproteínas de baja densidad del plasma, β cloroalanina y esfingofunginas, son inhibidoras del primer paso en la vía biosintética *de novo* (serina palmitol transferasa), esta inhibición reduce la formación de SA y SO, por lo tanto sería improbable el incremento de la relación SA/SO por efecto de dichos compuestos (Chatterjee y col., 1986).

Factores que alteran el reciclaje metabólico de esfingolípidos, pudieran afectar la relación SA/SO, tal es el caso de agonistas de neutrófilos que inducen cambios en las concentraciones de esfingosina libre, independiente de la biosíntesis *de novo*. Estos cambios son el resultado de la liberación de esfingosina libre derivada de esfingolípidos pre-existentes, la esfingosina libre que es liberada de esta manera, es rápidamente reaclilada y la elevación de esfingosina es un fenómeno transitorio dependiente del balance entre la hidrólisis y la reaclilación, siendo fluctuante la relación SA/SO en células. Por lo tanto, los cambios de la relación SA/SO en suero u orina requiere de una alteración persistente en los niveles celulares de esfingosina libre, que pudiera ocurrir si la reaclilación fuera dañada, como es el caso con FBs, o posiblemente si la inhibición del catabolismo ocurriera con el modelo de la enfermedad de Niemann-Pick Tipo C. Finalmente la elevación de las concentraciones de esfingosina libre en suero pudiera ser el resultado del daño o de la muerte celular, posiblemente resultante de la liberación de enzimas hidrolíticas y/o de la liberación de las bases esfingoides a partir de las vacuolas secuestrantes dentro de la célula. Este último fenómeno parece ocurrir en ponies antes de la muerte, observándose incremento marcado de esfingosina libre y del complejo de esfingolípidos en suero (Wang y col., 1992).

El estudio de la toxicocinética de la FB₁ demostró que es eliminada rápidamente del suero en monos vervet, esta rápida eliminación así como la baja disponibilidad y la escasez de los principales metabolitos, implica que la medición directa de FBs en suero no sería un biomarcador apropiado de la exposición de dichas micotoxinas (Shephard y col., 1994).

Numerosos estudios se han desarrollado en varias especies animales que consumen raciones contaminadas con FBs, estableciéndose que la relación SA/SO es un potencial biomarcador de la exposición a dichas micotoxinas. En estos estudios, SA y SO fueron determinados en plasma, orina y varios tejidos, observándose elevación de la relación SA/SO debido a la inhibición de la enzima clave de la biosíntesis de esfingolípidos, la ceramida sintasa. Sin embargo, la mayoría de estos estudios, han utilizado niveles de exposición a FBs relativamente altos, con el propósito de investigar la respuesta patológica por la ingestión de fumonisinas. Por ejemplo, Wang y col., (1992) describieron la elevación de la relación SA/SO en ponies con niveles de 22,000 y 44,000 µg de FB₁/kg de alimento. Subsecuentemente, la

alteración del metabolismo de esfingolípidos fue demostrada por la elevación de la relación detectada en suero de cerdos alimentados con 1,500 μg de FB_1/kg de peso vivo por día (Haschek y col., 1993), en suero y orina de conejos alimentados con 1,000 μg de FB_1/kg de peso vivo/día (Gumprecht y col., 1995) y en el suero de ratas alimentadas con 13,600 μg de FB_1/kg de peso vivo/día (Voss y col., 1995). Recientes estudios en primates no humanos (monos vervet) expuestos a altos y bajos niveles de material cultivado con *F. verticillioides* mostraron elevación significativa en suero. Las relaciones promedio de SA/SO fueron de 0.43 en los controles, 1.72 en los animales con dosis bajas (300 μg de FBs/kg de peso vivo/día) y de 2.57 en los que recibieron dosis altas (800 μg de FBs/kg de peso vivo/día) (Shephard y col., 1996). Simultáneas determinaciones de las bases esfingoides en orina mostraron relaciones de 0.87 en controles y de 1.58 y 2.17 en los grupos experimentales respectivamente, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas debido a la amplia variación dentro de cada grupo.

A diferencia de los biomarcadores de los aductos de AFs, los cuales solo se presentan en animales o humanos expuestos a las toxinas, la relación SA/SO tiene un nivel normal en animales (control) no expuestos a FBs. Es claro, que la sensibilidad de la relación SA/SO en suero y orina como biomarcador de la exposición a fumonisinas es diferente entre las diversas especies animales.

I.4.3. Efectos de las fumonisinas en aves

El consumo de dietas contaminadas con *F. verticillioides* en pollos de engorda, se asocia a la producción de cambios funcionales en las aves como: necrosis hepática multifocal, hiperplasia biliar, reducción en el peso corporal, de hígado y bazo, anormalidades esqueléticas (arqueo de patas), alteración en los parámetros bioquímicos y elevada mortalidad (Espada y col., 1994). En pavos se han observado alteraciones en el miocardio. Con el motivo de correlacionar el nivel de FBs presentes en las dietas con la toxicidad en pollos de engorda, algunos investigadores trabajaron con dietas fermentadas de maíz con *F. verticillioides* que contenían niveles de 75 a 525 mg FB_1/kg de alimento, y observaron que con dosis superiores a 150

mg/Kg se presentaban síntomas evidentes de toxicidad, mientras que con 75 mg/Kg se observaban efectos más sutiles.

Li y col. (1999) informaron que FB₁ presenta efectos inmunosupresivos en pollos cuando se adiciona a la dieta a razón de 200 mg/kg. Por lo tanto, el Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana, a través del Laboratorio de Diagnóstico recomienda no destinar para el consumo de aves de corral alimentos con un contenido de FB₁ superior a 50 ppm (Riley y col., 1993).

En base a la información que se presenta el presente estudio pretende evaluar el uso de los manano oligosacáridos derivados de las paredes celulares de *S. cerevisiae*, el cual además incluye otros compuestos como β ,3- β 1, 6 d-Glucanos, activadores del sistema inmune, enzimas digestivas que optimizan la utilización del alimento; levaduras vivas que aportan ácidos grasos y vitaminas del complejo B; bacterias microencapsuladas (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* y *Bacillus subtilis*), como reemplazadores de la microflora esencial para disminuir la incidencia de trastornos gastrointestinales, además de inmunoglobulinas como preventivo de infecciones.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas producidas principalmente por *Fusarium verticillioides*, de alta incidencia en maíz. Son responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino, además de ocasionar necrosis hepática y anomalías óseas en pollos de engorda. En humanos existe estrecha relación con cáncer esofágico en regiones de Sudáfrica, India y China (Norred y Voss, 1994).

Existen estrategias para controlar la contaminación por micotoxinas, como son la prevención de la infección fúngica en campo, la cual involucra manejo agronómico durante el cultivo, en la cosecha y post-cosecha. Sin embargo, cuando la contaminación con micotoxinas se presenta sobrepasando dichas medidas, deben adoptarse estrategias de descontaminación, como son los tratamientos químicos, biológicos y físicos (Galvano y col., 2001).

Se han desarrollado métodos químicos para la destrucción o inactivación de micotoxinas, sin embargo, la mayoría no satisfacen los criterios de aceptabilidad, ya que disminuyen el valor nutricional del producto o generan metabolitos residuales tóxicos. Los métodos biológicos, se fundamentan en la presencia de un microorganismo controlador o en la acción de compuesto químicos específicos producidos por éste, que inhiben el crecimiento del hongo productor o directamente la producción de sus toxinas, sin embargo, la utilización de éste método debe evaluarse con mayor profundidad para evitar otros riesgos de patogenicidad (Basappa y Shantha, 1996).

Entre los métodos físicos, se incluye el uso de adsorbentes para la prevención de las micotoxicosis, consiste en el uso de sustancias inertes incorporadas a las raciones que actúan posteriormente secuestrando a las toxinas en el tracto gastrointestinal y reduciendo la biodisponibilidad de las mismas. En el mercado se presentan diversos materiales adsorbentes, como son las zeolitas y los manano oligosacáridos derivados de las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales han mostrado eficiente capacidad de adsorción para las aflatoxinas. Sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto de dichos adsorbentes en dietas contaminadas con fumonisinas.

III. JUSTIFICACIÓN

La importancia del sector avícola en México radica en el papel estratégico que juega en la nutrición de la población humana. A nivel mundial es el cuarto productor de pollo y el sexto en huevo. La producción de carne de pollo en México en el 2003, fue de 2'268,589 toneladas con un valor de 28,901 millones de pesos en promedio anual, además el consumo per cápita de carne de pollo ha aumentado de 15.7 Kg/año en 1995 a 22.4 Kg/año en el 2003 (Unión Nacional de Avicultores, 2003).

Puesto que uno de los problemas de mayor impacto económico para la avicultura son las micotoxicosis, el presente estudio pretende evaluar el uso de adsorbentes, tanto naturales como de origen mineral, en las raciones de pollo de engorda, que permitan reducir la absorción de las micotoxinas en el tracto digestivo e incrementen la eficiencia alimenticia.

Recientes investigaciones han demostrado que el uso de biomarcadores puede ser una herramienta de gran utilidad en los estudios epidemiológicos relacionados con micotoxicosis (Turner y col., 1999), además de auxiliar en la evaluación del uso de adsorbentes. En el caso de fumonisinas los biomarcadores SA/SO en suero, han sido reconocidos como indicadores moleculares de la exposición a fumonisinas.

IV. HIPÓTESIS

El uso de sustancias adsorbentes (clinoptilolita y manano oligosacáridos) adicionados al alimento, reduce los efectos tóxicos en pollos de engorda alimentados con raciones contaminadas con fumonisinas.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Valorar el efecto de la inclusión de clinoptilolita y manano oligosacáridos en el alimento de pollos de engorda contaminado con fumonisinas, mediante parámetros productivos, valores bioquímicos e histológicos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinación "*in vitro*" del nivel de inclusión de la clinoptilolita en las dietas de pollo de engorda.
2. Determinar los parámetros productivos en pollos de engorda alimentados con dietas experimentales con dos niveles de fumonisinas (75 y 100 mg/Kg) con y sin adsorbentes (clinoptilolita y manano oligosacáridos).
3. Evaluar la actividad enzimática de aspartato amino transferasa (AST), alanino amino transferasa (ALT) y niveles de proteínas totales en suero de pollo de engorda por efecto del consumo de alimento contaminado con fumonisinas.
4. Determinar la relación SA/SO en suero de pollo de engorda por efecto del consumo de alimento contaminado con fumonisinas como biomarcador molecular de la exposición a fumonisinas.
5. Determinar la concentración de proteínas totales y de glutatión reducido (GSH) en tejidos (hígado y riñón) y el peso de órganos (hígado, riñón, corazón, bazo y bolsa de Fabricio) de pollos de engorda alimentados con dietas experimentales con dos niveles de fumonisinas (75 y 100 mg/Kg).
6. Realizar un estudio histopatológico de tejidos (hígado y riñón) de los pollos de engorda alimentados con las raciones experimentales.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo es una investigación de tipo experimental con un diseño completamente al azar, se llevó a cabo en el Laboratorio de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara y en colaboración con el Departamento de Clínica Veterinaria del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

6.1. Etapa I. Determinación “*in vitro*” del nivel de inclusión de la clinoptilolita.

La evaluación de la capacidad de adsorción de FB₁ por clinoptilolita se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Phillips y col. (1988). Se preparó una solución metanólica stock del estándar de FB₁ pura (Sigma-Aldrich). La solución de trabajo se preparó por dilución de la solución stock en buffer pH 2. La concentración de esta solución fue de 3.5 µg/mL de FB₁. Se pusieron en contacto 2 mL de la solución de trabajo (7 µg FB₁) con 5 concentraciones de la clinoptilolita (5, 25 y 75 mg). Se realizaron 3 diluciones a pH 2, 4 y 6; en 10 tubos de ensayo por cada una de estas. Se incluyó el testigo de las FBs y control blanco con el adsorbente y la solución reguladora. Los tubos se agitaron a 400 r.p.m. durante 1 hora a 39.5 ± 0.1 °C. Las soluciones se decantaron, y se tomaron 1.5 mL de cada sobrenadante, centrifugándose a 16,060 gravedades durante 1 hora. La concentración de FBs en el sobrenadante se determinó por HPLC según las metodologías propuestas por Trucksess y col. (1994) y Shephard y col. (1990).

El porcentaje de FBs adsorbido por la clinoptilolita, se estimó a partir de la concentración inicial de toxina en la correspondiente solución de trabajo y final en el sobrenadante después de la incubación con el adsorbente. Los resultados fueron expresados como la media de tres repeticiones.

6.2. Etapa II. Evaluación del uso de adsorbentes.

Esta etapa del estudio se realizó en la caseta experimental del Departamento de Clínica Veterinaria del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Para efectuar dicha prueba inicialmente se contaminó maíz con fumonisinas y posteriormente se formularon las dietas a evaluar.

6.2.1. Producción de fumonisinas a partir de una cepa de *Fusarium verticillioides*

Para la producción de FBs se colocaron 1,000 g de maíz comercial en matraces Erlenmeyer de 2 L, se hidrataron con 350 mL de agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 121°C por 30 minutos, dos veces durante dos días consecutivos. Posteriormente los granos se inocularon con una suspensión preparada con la cepa de *F. verticillioides* productora de altos niveles de FBs (M7075) y agua destilada estéril, se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 28 días. Para evitar la formación de cúmulos por efecto de la fermentación, los matraces se agitaron manualmente durante los primeros días de incubación.

Después del periodo de incubación los granos se esterilizaron nuevamente a 121°C con la finalidad de inactivar el hongo, después se secaron a 60°C durante 72 hrs y se molieron finamente en molino de cuchillas para su posterior cuantificación.

6.2.1.1. Extracción y detección de fumonisinas por cromatografía de líquidos (HPLC).

La cuantificación de las FBs se realizó a partir de 25 g del grano molido, las toxinas se extrajeron con 50 mL de una mezcla de metanol:agua (3:1), se agitó el extracto 30 minutos en agitador rotatorio, luego se filtró a través de papel Whatman No. 4, se tomaron 10 mL del filtrado y se pasó a través de un cartucho SAX (bond elut strong anion-exchange) previamente acondicionado por el pasaje de 5 mL de metanol seguido de 5 mL de metanol:agua (3:1), después de pasar el filtrado, el cartucho se lavó con 3 mL de metanol:agua (3:1) seguido de 3 mL de metanol. Las FBs fueron eluidas con 14 mL de una solución de ácido acético al 0.5% en metanol. El eluato se evaporó a sequedad a 40°C bajo nitrógeno y el extracto seco se

guardó a 4°C hasta el momento de su análisis por HPLC (Shephard y col., 1990 modificada por Doko y col., 1995).

Para la detección y cuantificación de las toxinas, el extracto seco se redisolvió en 200 µL de acetonitrilo:agua (1:1), después 50 µL del extracto diluido se derivatizó con 200 µL de una solución de O-phthaldialdehído (OPA). La solución derivatizante se preparó disolviendo 40 mg de OPA en 1 mL de metanol, adicionando 5 mL de tetraborato de sodio 0.1 M y 50 µL de 2-mercaptoetanol. Las FBs derivatizadas (20 µL) se analizaron mediante un sistema de detección con fluorescencia en HPLC. El sistema HPLC consistió de una bomba Hewlett Packard (HP) 1100 conectado a un detector de fluorescencia y a un integrador HP. Las separaciones cromatográficas se hicieron en una columna de fase reversa C₁₈ (150 X 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula, Supelcosil LC-ABZ, Supelco) conectado a una precolumna Supelguard LC-ABZ (20 X 4.6 mm, y 5 µm de tamaño de partícula, Supelco). Como fase móvil se utilizó metanol:fosfato de sodio monobásico 0.1 M (75:25), el pH de la solución fue ajustado a 3.35 ± 0.5 con ácido ortofosfórico. El flujo de la fase móvil fue de 1.5 mL/min, el rango de excitación y emisión de 335 y 440 nm respectivamente.

6.2.2. Prueba experimental en pollos

Bajo un diseño experimental completamente al azar se seleccionaron 162 pollos machos de engorda de la estirpe Ross, de un día de edad y se formaron 9 grupos (tratamientos) de 6 pollos cada uno con tres repeticiones por tratamiento (tabla 3). Se prepararon dietas que incluyeron dos niveles de fumonisinas (75 mg/Kg y 100 mg/Kg) y se agregaron los adsorbentes: clinoptilolita (2.5 Kg/ton de alimento) y manano oligosacáridos (2 kg/ton de alimento) por cada inclusión de FBs, dichas dietas fueron formuladas ajustando la proporción del maíz contaminado, con los otros ingredientes de manera que mantuvieron niveles isoprotéicos e isoenergéticos. La etapa experimental tuvo una duración de 42 días de engorda

Tabla 3. Diseño experimental para la evaluación del efecto del consumo de alimento contaminado con fumonisinas y el uso de adsorbentes.

TRATAMIENTO	ALIMENTO	N	REPETICIONES	TOTAL
T1	Control	6	3	18
T2	Clinoptilolita	6	3	18
T3	Manano oligosacáridos	6	3	18
T4	75 ppm fumonisinas	6	3	18
T5	75 ppm fumonisinas + clinoptilolita	6	3	18
T6	75 ppm fumonisinas + manano oligosacáridos	6	3	18
T7	100 ppm fumonisinas	6	3	18
T8	100 ppm fumonisinas + clinoptilolita	6	3	18
T9	100 ppm fumonisinas + manano oligosacáridos	6	3	18
No. total de pollos				162

Una vez preparadas las raciones (tabla 4 y 5) de los diferentes tratamientos se procedió a determinar los niveles de micotoxinas (AFs, OAs y FBs) y a la confirmación de los nutrientes que incluían las raciones mediante el análisis bromatológico.

Los pollos se vacunaron contra la enfermedad de Newcastle al día 1, 12, 24 y 32; Bronquitis y Gumboro al día 12 de edad. El alimento y agua se proporcionaron *Ad-libitum*. Todos los grupos recibieron durante la primera semana de edad el alimento control de iniciación y a partir del día 14, consumieron las dietas preparadas de cada tratamiento experimental durante una semana.

Tabla 4. Raciones preparadas para los diferentes tratamientos (Kg/100 Kg) en la prueba experimental en pollo de engorda.

Ingredientes	T1		T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
	I	F								
Sorgo	67.1	60.2	67.0	67.0	33.5	33.5	33.5	-	-	-
Maíz-fumonisina	----	----	---	---	33.5	33.5	33.5	67.0	67.0	67.0
Aceite soya	3.9	4.6	4.0	4.0	4.0	3.75	3.8	4.0	3.75	3.5
Micros-iniciación	4.0	5.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Pasta de soya	20.0	30.2	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Clinoptilolita	---	---	0.25	---	---	0.25	---	---	0.25	---
Manano olig.	---	---	---	0.02	---	---	0.02	---	---	0.02
H. de pescado	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Análisis calculado										
Materia seca	90.9	84.0	90.9	90.9	90.9	90.9	90.9	90.9	90.9	90.9
Proteína cruda	22.7	18.9	22.7	22.7	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.9
Energía (Mcal/Kg)	2.91	2.82	2.92	2.92	2.92	2.90	2.90	2.92	2.90	2.90

I: Iniciación F: Finalización T1: Control T2: Clinoptilolita T3: Manano oligosacáridos T4 : 75 mg/Kg de fumonisinas T5: 75 mg/Kg fumonisinas+ Clinoptilolita T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos T7 : 100 mg/Kg fumonisinas T8:100 mg/Kg fumonisinas + Clinoptilolita T9:100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos.

Para la evaluación de los parámetros productivos de los pollos de engorda se consideró: pesos promedio (PP), consumo de alimento diario por ave (CADA), ganancia diaria de peso (GDP), conversión alimenticia (CA), eficiencia alimentaria (EA), índice de productividad (IP) y punto de desenvolvimiento (PD). Lo anterior se realizó en forma semanal durante las siete semanas del experimento en los grupos control y tratados. Esto se llevó a cabo mediante registros semanales de los datos y la aplicación de fórmulas respectivas para su cálculo.

El peso promedio se obtuvo a partir del peso total de los pollos en cada tratamiento y repetición divididos entre el número de aves; la ganancia diaria de peso, es el promedio de peso por ave entre la edad en días del ave (al término de experimento); la eficiencia alimentaria se calculó dividiendo 1,000 entre el índice de conversión; el índice de productividad se obtuvo al multiplicar la ganancia diaria de peso por ave por el porcentaje de viabilidad de la parvada, esto se divide entre el producto del índice de conversión por 10; el índice de conversión es igual al total de kilos de alimento consumidos entre el total de kilos de carne producidos; respecto al punto de desenvolvimiento, éste se calculó multiplicando el peso vivo del ave en kilos por 2.2 menos el índice de conversión por 100; por último el índice de eficiencia se obtuvo dividiendo el peso del ave en kilos entre el índice de conversión y multiplicando por 100.

Los estudios que se llevaron a cabo en el laboratorio fueron: proteínas totales en suero y tejidos; AST y ALT, GSH, esfingarina y esfingosina en suero y determinación de glutatión reducido (GSH) en hígado y riñón; además del estudio histopatológico de tejidos.

6.2.2.1. Técnica para la determinación de AST en suero

Para este procedimiento se empleó un kit de soluciones ya preparadas Sera Pak Plus. Se colocaron 100 μ L de suero en un tubo de ensayo y se agregó 1 mL de reactivo de trabajo, se mezcló e incubó a 37°C y tras una incubación de 1 minuto se midió el cambio de absorbancia contra agua destilada, durante 3 minutos a 340 nm en espectrofotómetro, para calcular las U/L de AST se multiplicó la diferencia de absorbancia por el factor 1.746 (IFCC, 1997).

6.2.2.2. Técnica para la determinación de ALT en suero

Para esta técnica se utilizó un kit de soluciones ya preparadas Sera Pak Plus. Se colocaron 100 μ L de suero en un tubo de ensayo y se agregó 1 mL de reactivo de trabajo, se mezcló e incubó a 37°C y tras una incubación de 1 minuto se midió el cambio absorbancia durante 3 minutos a 340 nm en espectrofotómetro, para calcular las U/L de ALT se multiplicó la diferencia de absorbancia por el factor 1.746 (IFCC, 1976).

6.2.2.3. Técnica para la determinación de proteínas totales en suero

Se colocaron 20 μ L de suero sanguíneo en un tubo de ensayo y se agregó 1 mL de reactivo de Biuret, de igual manera se hizo un blanco con agua destilada y un patrón de concentración conocida, se agitaron los tubos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, al cabo de este tiempo se leyó la absorbancia de las muestras y del patrón frente al blanco a 545 nm en espectrofotómetro, la concentración de proteína de la muestra se calculó a partir de la absorbancia de la muestra sobre la absorbancia del patrón por la concentración del patrón (Tietz, 1999).

6.2.2.4. Técnica para la determinación de los niveles de SA y SO en suero

Se mezclaron 0.5 mL de suero con 1.5 de cloruro de potasio al 0.8%, más 50 μ L de hidróxido de potasio 1 M y se procedió a la extracción con 4 mL de acetato de etilo, agitando por rotación durante 20 minutos. Se centrifugó a 1,100 rpm durante 15 minutos y se recuperó la fase orgánica, se evaporó a sequedad a 55°C bajo flujo de nitrógeno. Las muestras se resuspendieron en 275 μ L de fosfato dibásico de potasio 0.07 M: metanol (1:9) y se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta precisión.

Los extractos purificados se derivatizaron con 25 μ L de reactivo OPA y se agitaron durante 30 segundos, un volumen de 50 μ L se inyectó en el cromatógrafo después de 30 minutos de la derivatización. El sistema HPLC consistió de una bomba Hewlett Packard (HP) 1100 conectado a un detector de fluorescencia HP 104 A y a un integrador HP. La separación se realizó en columnas de fase reversa C₁₈ (Supercosil LC-ABZ+plus) de 15 cm x 4.6 D.I. y tamaño de partícula de 5 μ m, con una precolumna de las mismas características. El flujo de la fase móvil fue de 0.8 mL/minuto, bajo el siguiente sistema de gradiente de solventes: 0-15 minutos: metanol (10%) y fosfato de potasio 0.07 M: metanol (1:9) (90%); 16-21 minutos: metanol (30%) y fosfato de potasio 0.07 M: metanol (1:9) (70%); 22-27 minutos: metanol (100%) y del minuto 28-35: metanol (10%) y fosfato de potasio 0.07 M: metanol (1:9) (90%), el rango de excitación y emisión fue de 335 y 440 nm respectivamente. La cuantificación de

SA/SO se realizó midiendo las áreas de los picos y extrapolando los valores en una curva de calibración (Castegnaro y col., 1998).

6.2.2.5. Técnica para la determinación de proteínas en tejidos

Se homogenizaron 250 mg de tejido con 3.75 mL de solución buffer fosfato EDTA y 1.0 mL de HPO_3 al 25% y centrifugó a 1,000 r.p.m. Se tomaron 0.5 mL de sobrenadante y agregaron 4.5 mL de buffer fosfato EDTA pH 8.0 y mezclaron. Se tomaron 100 μL de esta mezcla y se agregaron 1.8 mL de buffer fosfato EDTA pH 8.0 con 100 μL de solución OPT. Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y leyó a 420 nm de emisión y 350 nm de excitación en un espectrofluorómetro Perkin LBS50 (Hissin y Hilf, 1976).

6.2.2.6. Técnica para la determinación de GSH en tejidos

Se colocaron 0.5 g de tejido en un homogenizador y se agregaron 5 mL de solución amortiguadora Tris HCl (10 mM, pH 7.4, EDTA 5 mM, sacarosa 250 mM, KCL 10 mM, a 4 grados centígrados) se centrifugó a 800 rpm, se tomaron 100 μL de sobrenadante y se agregaron 9.9 mL de agua desionizada y se mezcló, de esta mezcla se tomaron 200 μL y se le agregó 800 μL de agua, 2 mL de reactivo A más 2.0 mL de tartrato de sodio y potasio al 2% y 2.0 mL de sulfato de cobre al 1%, se dejó incubar por 15 minutos y se agregó 1.0 mL de reactivo de folin (1:6), se incubó por 45 minutos y se leyó a 750 nm en un espectrofotómetro UV Varian DMS 80, para obtener el resultado se realiza una curva patrón con albúmina sérica bovina y sobre ésta se leen las absorbancias obtenidas (Peterson, 1997).

6.2.2.7. Peso de órganos

Las aves fueron esadas en forma semanal, se sacrificó un pollo por cada repetición y tratamiento a los 7 y 21 días post-exposición a FBs, utilizando la técnica de dislocación cervical. Se realizó la necropsia y se tomaron los órganos de interés para el estudio (hígado, riñón, corazón, bazo y bolsa de Fabricio), los órganos fueron pesados de manera individual e

independiente, se registraron los pesos absolutos y relativos, se ordenaron y analizaron estadísticamente.

6.2.2.8. Estudio Histopatológico

Para realizar el estudio histopatológico de los tejidos se sacrificó un animal de cada tratamiento y de cada repetición, inmediatamente después se extrajeron las vísceras y se separaron hígado y riñón, los cuales se fijaron por inmersión en solución formalina al 10% estabilizada. Muestras representativas de 1 cm³ se sometieron al procesamiento rutinario histológico con deshidratación en series crecientes de etanol, aclaración con xilol e inclusión en parafina, utilizando un procesador de tejidos Lipshow modelo 1000. Se realizaron cortes de 3-5 µm de espesor y se tiñeron con la tinción de hematoxilina y eosina, para su estudio descriptivo al microscopio de luz.

6.3. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron contrastados estadísticamente mediante análisis de varianza y prueba de Tukey a un nivel de confianza de 99 y 95 %, con el programa estadístico SAS (1996).

VII. RESULTADOS

7.1. Determinación "in vitro" del nivel de inclusión de la clinoptilolita

La mayor adsorción de la clinoptilolita se apreció con la concentración de 75 mg a pH 4 y fue de 78.7%. Observándose menor adsorción a pH 2 (20.5 %) y pH 6 (35.5%). En las concentraciones de 5 y 25 mg de clinoptilolita no hubo adsorción en ninguno de los diferentes pH.

7.2. Contaminación natural por micotoxinas en las dietas

Una vez preparadas las dietas de los diferentes tratamientos se procedió a determinar los niveles de micotoxinas mediante inmunoensayo enzimático y se determinó el análisis proximal de las raciones mediante las técnicas descritas por la AOAC. La tabla 5 muestra los niveles de aflatoxinas (AFBs) y ocratoxinas (OAs) encontrados en las dietas experimentales, valores que se consideraron relativamente bajos.

Tabla 5. Niveles de micotoxinas en las dietas experimentales para pollos de engorda.

Micotoxina (ppb)	T1 Control		T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
	Ini	Fin								
Aflatoxina (20 ppb)	3.2	4.7	4.5	3.9	5.7	3.9	4.2	6.8	8.0	7.5
Ocratoxina (10 ppb)	3.8	7.1	4.3	2.2	3.1	1.5	4.4	3.4	3.4	2.8

Los niveles en el paréntesis indican los límites permisibles para pollo; Ini: Alimento de iniciación; Fin: Alimento de finalización, T1: control, T2: control + clinoptilolita, T3: Manano oligosacáridos, T4: 75 mg/Kg fumonisinas, T5: 75 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos, T7: 100 mg/Kg fumonisinas, T8: 100 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T9: 100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos.

7.3. Parámetros productivos

Los valores de los diferentes parámetros productivos se analizaron estadísticamente a los 14, 21, 35 y 42 días de edad del pollo con el propósito de evaluar el efecto del consumo de FBs entre los 14 y 21 días, semana en la que se expusieron los pollos a los niveles de dicha micotoxina mencionados anteriormente. Los resultados no presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos en las diferentes etapas estudiadas, sólo se presentan los valores de los parámetros al término de la engorda a los 42 días (tabla 6).

El consumo de alimento observado durante la prueba experimental se mantuvo en un rango de 4.46 a 4.69 Kg/ave de manera acumulada a los 42 días, correspondiendo el mayor consumo al tratamiento que contenía 100 mg/Kg de FBs y el menor al control. Los pesos promedio de las aves oscilaron de 1.95 Kg (control) a 2.18 Kg (tratamiento con manano oilosacáridos: T3). Respecto a la ganancia diaria de peso (GDP), los valores oscilaron de 44 a 51 g, el tratamiento que incluyó solamente manano oligosacáridos obtuvo los mayores valores, sin ser diferente estadísticamente a los otros tratamientos.

La eficiencia alimentaria (EA) observada al término de la engorda coincide con lo observado en el parámetro de ganancia de peso diaria mostrando la mayor eficiencia (593) el tratamiento que incluyó sólo manano oligosacáridos y la menor (520) el tratamiento que contenía 100 mg/Kg de FBs, mismo tratamiento que mostró el mayor consumo de alimento, se considera aceptable una eficiencia alimentaria de 480 Kg de carne/ tonelada de alimento, por lo que si se comparan los valores obtenidos en los grupos estudiados, todos superan el valor aceptable.

En relación al índice de productividad (IP) los valores mostrados en los diferentes tratamientos oscilaron de 237.76 a 302.52 los que corresponde al tratamiento con 75 mg/Kg de FBs + manano oligosacáridos (T7) y el tratamiento sólo con manano oligosacáridos (T3) respectivamente, en términos generales todos los tratamientos fueron semejantes. El índice de conversión (IC) al término de estudio osciló de 1.7 a 1.9, el grupo con mejor índice de conversión lo presentó el tratamiento que únicamente incluyó manano oligosacáridos (T3) y el peor el tratamiento con 100 mg/Kg de FBs sin adsorbente (T5).

Los valores reportados para el punto de desenvolvimiento (PD) de los pollos al finalizar la prueba experimental variaron entre 238 y 312, correspondiendo el mayor al tratamiento con manano oligosacáridos (T3), y el menor al tratamiento que incluía 75 mg/Kg de FBs más manano oligosacáridos (T7). El índice de eficiencia (IE) que se observó en los diferentes tratamientos varió de 108 a 130.

7.4. Determinación de los niveles de AST, ALT y proteínas totales en suero de pollos

La tabla 7 muestra los valores de AST y ALT y proteínas totales en suero, determinadas en los diferentes tratamientos. La actividad enzimática de la AST, fue mayor estadísticamente ($p < 0.05$) con 150 U/L en los tratamientos que incluyeron 75 mg/Kg de FBs (T4) y con 75 mg/Kg de FBs + manano oligosacáridos (T6), mostrando el control y el tratamiento que incluyó manano oligosacáridos (T3) los valores menores (90 y 83.3 U/L respectivamente). No se observaron diferencias significativas a los 21 días post-exposición, los valores oscilaron entre 133 y 277 U/L.

La determinación de la actividad de ALT en las dos etapas estudiadas mostró niveles estadísticamente similares ($p > 0.05$) al control, el cual presentó niveles de 20 U/L en ambas etapas, mientras que los niveles mayores los presentó el tratamiento con 75 mg/Kg de FBs + clinoptilolita (T5).

Respecto a los niveles de proteínas totales en suero, se observó diferencia estadística ($p < 0.05$) en el día 7 post-exposición a las FBs, los niveles mayores fueron mostrados por el tratamiento control (3.2 g/dL) y el tratamiento que solo incluyó manano oligosacáridos (T3), mayores estadísticamente al tratamiento con 75 mg/Kg de FBs + clinoptilolita (T5) el cual reportó 1.9 g/dL. Los niveles de proteínas totales a los 21 días post-exposición fueron similares al control (2.8 g/dL) mostrando niveles mayores estadísticamente ($p < 0.05$) el tratamiento T3 con 4.0 g/dL.

Tabla 6. Niveles promedio de los parámetros productivos al término de la prueba experimental con los pollos de engorda.

T	PP (Kg)		GDP (g)		EA		IP		IC		PD		IE	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
T1	1.95	0.221	45	5.272	553	47.92	252.54	52.08	1.8	0.149	247	63.42	108	22.03
T2	1.98	0.131	46	3.115	543	40.13	249.66	32.60	1.9	0.137	251	42.43	107	14.99
T3	2.18	0.148	51	3.517	593	15.95	302.52	26.47	1.7	0.045	312	35.84	130	11.33
T4	1.99	0.013	46	0.317	563	5.39	261.11	3.78	1.8	0.017	261	4.23	112	1.66
T5	1.99	0.078	46	1.869	577	25.35	263.57	22.93	1.8	0.079	262	25.05	113	9.57
T6	1.90	0.111	44	2.652	552	24.42	245.19	25.88	1.8	0.078	234	31.91	105	10.77
T7	1.97	0.040	46	0.957	520	8.81	237.76	5.46	1.9	0.033	241	8.76	102	2.42
T8	2.05	0.115	48	2.741	577	41.16	276.18	35.23	1.7	0.126	278	37.78	119	14.99
T9	2.07	0.039	49	0.931	567	25.55	273.75	16.25	1.8	0.082	279	14.62	117	6.77

T: tratamiento, PP: peso promedio, GDP: ganancia diaria de peso, EA: eficiencia alimentaria, IP: índice de productividad, IC: índice de conversión, PD: punto de desenvolvimiento, IE: índice de eficiencia, \bar{x} : promedio, s: desviación estándar, Kg: kilogramos, g: gramos, T1: control, T2: control + clinoptilolita, T3: Manano oligosacáridos, T4: 75 mg/Kg fumonisinas, T5: 75 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos, T7: 100 mg/Kg fumonisinas, T8: 100 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T9: 100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos.

Tabla 7. Actividades enzimáticas promedio de AST, ALT y proteínas totales en suero de pollos al día 7 y 21 post-exposición a fumonisinas.

	AST U/L				ALT U/L				Proteínas totales g/dL			
	7 días post- exposición		21 días post- exposición		7 días post- exposición		21 días post- exposición		7 días post- exposición		21 días post- exposición	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
T1	90.0 b	26.46	136.7	30.55	20.0	10.00	20.0	0.00	3.2ab	0.42	2.8	0.56
T2	130 ab	17.32	193.3	55.08	26.6	20.82	43.3	25.17	2.9abc	0.19	2.8	0.60
T3	83.3 b	11.54	276.7	185.02	26.6	5.77	26.7	11.55	3.5 a	0.36	4.0	0.26
T4	150 a	36.06	200.0	70.00	27.0	15.28	23.3	5.77	2.4 bc	0.40	3.2	0.45
T5	133 ab	23.09	156.7	20.82	26.6	5.77	13.3	5.77	1.9c	0.40	2.9	1.07
T6	150 a	10.00	170.0	36.06	36.7	28.87	83.3	0.00	2.2 bc	0.57	2.6	0.37
T7	133ab	15.28	133.3	15.28	26.6	5.77	13.3	5.77	2.2 bc	0.28	3.6	0.70
T8	133ab	15.28	150.0	30.00	26.6	5.77	13.3	5.77	2.9abc	0.14	3.1	0.15
T9	137 ab	5.77	133.3	23.09	30.0	0.00	23.3	5.77	2.4 bc	0.39	2.8	0.65

T1: control, T2: control + clinoptilolita, T3: Manano oligosacáridos, T4: 75 mg/Kg fumonisinas, T5: 75 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos, T7: 100 mg/Kg fumonisinas, T8: 100 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T9: 100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos.
Las literales indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre tratamientos.

7.5. Relación SA/SO en suero de pollos

Respecto a los niveles de SA, SO y la relación SA/SO determinados en suero sanguíneo se muestran en la tabla 8. Se observó diferencia estadística ($p < 0.05$) en los niveles de SA (11.16 ng/mL) del tratamiento con 100 mg/Kg de FBs con respecto al control (1.9 ng/mL) a los 7 días y similares a los 21 días post-exposición. Mientras que los niveles de SO no presentaron diferencias significativas en las etapas estudiadas ($p < 0.05$). Sin embargo al analizar la relación SA/SO se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a los 7 días post-exposición.

Tabla 8. Niveles de SA y SO y relación SA/SO determinados en suero sanguíneo de pollos al día 7 y 21 post-exposición a fumonisinas.

	SA				SO				Relación SA/SO			
	7 días post-exposición		21 días post-exposición		7 días post-exposición		21 días post-exposición		7 días post-exposición		21 días post-exposición	
	\bar{x}	S	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
T1	1.90 b	0.196	1.91	0.295	4.88	1.109	4.56	1.015	0.40 b	0.0624	0.43ab	0.111
T2	2.24ab	0.510	1.79	0.451	9.26	4.066	2.80	1.305	0.27b	0.098	0.68a	0.131
T3	1.71 b	0.058	1.77	0.283	7.09	2.541	3.45	1.392	0.27b	0.114	0.55ab	0.121
T4	1.67 b	0.913	1.68	0.179	5.89	0.739	2.88	0.861	0.28b	0.136	0.61ab	0.100
T5	8.82ab	5.908	1.59	0.095	5.88	0.923	2.95	0.502	1.57ab	1.138	0.55ab	0.093
T6	10.27ab	4.473	1.69	0.181	5.23	0.556	2.91	0.751	2.03a	1.008	0.60ab	0.105
T7	11.16 a	3.075	1.72	0.219	6.48	1.571	4.47	1.626	1.85ab	0.806	0.41ab	0.110
T8	5.41ab	6.871	2.04	0.708	5.98	0.955	5.98	2.342	0.84ab	1.040	0.35b	0.044
T9	5.96ab	5.031	2.14	0.610	7.54	4.125	4.68	1.870	1.00ab	0.750	0.48ab	0.121

T1: control, T2: control + clinoptilolita, T3: Manano oligosacáridos, T4: 75 mg/Kg fumonisinas, T5: 75 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos, T7: 100 mg/Kg fumonisinas, T8: 100 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T9: 100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos.

Las literales indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre tratamientos.

7.6. Proteínas en hígado y riñón

La tabla 9 muestra los valores de proteínas en hígado y riñón determinados en los diferentes tratamientos, los niveles detectados a los 7 días post-exposición en hígado variaron entre 16.7 y 18.6 mg/100 mg de tejido, similares en todos los tratamientos con el control (16.7). En riñón los valores oscilaron de 11.8 a 15.7 mg/100 mg de tejido y a los 21 días post-exposición de 12.6 a 16.1 mg/100 mg de tejido similares en ambas etapas a los mostrados por el control.

En hígado sólo se encontró diferencia estadística ($p < 0.05$) a los 21 días post-exposición, mostrando los niveles mayores el T5 (75 mg/Kg de FBs + clinoptilolita) con 18.8 mg/100 mg de tejido mayor significativamente ($p < 0.05$) que el control (15.1 mg/100 mg de tejido).

Tabla 9. Valores de proteínas (mg/100mg de tejido) en hígado y riñón de pollo al día 7 y 21 post-exposición a fumonisinas.

T	Hígado				Riñón			
	7 días post-exposición		21 días post-exposición		7 días post-exposición		21 días post-exposición	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
T1	16.70	2.43	15.10 ab	2.67	14.90	1.25	15.90	1.76
T2	16.90	0.84	14.10 b	1.62	14.50	1.99	16.10	2.01
T3	17.60	1.06	14.40 ab	1.35	13.40	2.74	15.80	1.33
T4	18.40	1.01	17.50 ab	1.46	13.60	1.67	16.60	3.63
T5	16.60	1.66	18.80 a	1.55	14.80	1.98	16.0	1.67
T6	15.70	3.90	17.60 ab	0.92	15.20	1.25	12.60	2.42
T7	16.70	0.55	16.80 ab	1.37	15.20	1.48	14.50	0.62
T8	18.60	1.36	15.0ab	0.12	11.80	0.83	16.10	1.60
T9	16.90	2.92	15.40 ab	2.36	15.70	1.58	14.80	1.17

T1: control, T2: control + clinoptilolita, T3: Manano oligosacáridos, T4: 75 mg/Kg fumonisinas, T5: 75 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos, T7: 100 mg/Kg fumonisinas, T8: 100 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T9: 100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos. Las literales indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre tratamientos

7.7. Glutation reducido (GSH) en tejidos de hígado y riñón

Los niveles de GSH encontrados en hígado a los 7 días oscilaron entre 64.67 $\mu\text{g/g}$ (T8: 100 mg/Kg de FBs + clinoptilolita) y 94.39 $\mu\text{g/g}$ (T7: 100 mg/Kg de FBs), diferentes estadísticamente ($p < 0.05$) entre ambos, sin embargo similares estadísticamente al tratamiento control (82.09 $\mu\text{g/g}$). A los 21 días post-exposición el tratamiento T8 (100 mg/Kg de FBs + clinoptilolita) mostró el mayor nivel (148.14 $\mu\text{g/g}$) siendo diferente estadísticamente ($p < 0.05$) con el control (45.93 $\mu\text{g/g}$), el cual fue similar a los tres tratamientos que recibieron FBs con 75 mg/Kg de FBs (T4), los valores menores correspondieron a los tratamientos que incluyeron sólo los adsorbentes (tabla 10).

Con respecto a los niveles de GSH en riñón sólo se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) a los 21 días. Los niveles de GSH en riñón al 7 días post-exposición oscilaron de 3.87 (T8: 100 mg/Kg + clinoptilolita) a 9.28 $\mu\text{g/g}$ (T1: control). Al día 21 post-exposición los niveles encontrados fueron mayores en todos los tratamientos respecto al nivel detectado en el control (0.81 $\mu\text{g/g}$) correspondiendo el mayor nivel de GSH (5.99 $\mu\text{g/g}$) al grupo que recibió el mayor nivel de FBs (T7: 100 mg/Kg de FBs).

Tabla 10. Niveles de glutatión reducido ($\mu\text{g/g}$ de tejido) en hígado y riñón de pollos a día 7 y 21 post-exposición a fumonisinas.

T	Hígado				Riñón			
	7 días post-exposición		21 días post-exposición		7 días post-exposición		21 días post-exposición	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	S	\bar{x}	s
T1	82.09 ab	3.75	45.93 bc	16.05	9.28	3.36	0.81 c	1.00
T2	69.43 ab	6.70	39.41 c	16.23	6.09	1.59	1.03 bc	0.72
T3	65.41 b	10.10	43.06 bc	12.32	8.65	7.94	3.89 abc	0.44
T4	68.69 ab	1.92	131.86 a	33.48	5.49	0.83	3.39 abc	0.51
T5	76.17 ab	11.36	138.98 a	9.80	5.14	1.04	5.08 ab	1.12
T6	72.11 ab	11.36	145.31 a	9.14	4.71	1.80	2.20 abc	0.78
T7	94.39 a	7.84	145.06 a	12.04	4.63	1.36	5.99 a	3.89
T8	64.67 b	4.04	148.14 a	13.11	3.87	1.40	3.51 abc	0.96
T9	64.74 b	14.25	103.56 ab	44.88	4.02	0.35	4.00 abc	0.93

T1: control, T2: control + clinoptilolita, T3: Manano oligosacáridos, T4: 75 mg/Kg fumonisinas, T5: 75 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos, T7: 100 mg/Kg fumonisinas, T8: 100 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T9: 100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos. Las literales indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre tratamientos

7.8. Peso de órganos

La tabla 11 presenta los pesos promedio de los órganos de los distintos tratamientos a los 7 post-exposición a FBs. Se observaron diferencias estadísticas en riñón y corazón mientras que en hígado, bazo y bolsa de Fabricio, los valores fueron similares entre tratamientos. El hígado al día 7 post-exposición alcanzó pesos entre 11.76 y 20.86 g; el bazo de 1.06 a 1.26 y la bolsa de Fabricio de 1.03 a 1.66 g; el grupo control mostró pesos de 20.8, 1.06 y 1.2 g para hígado, bazo y bolsa de Fabricio respectivamente. Respecto a los pesos registrados para riñón, todos los tratamientos fueron estadísticamente similares al grupo control (5.8 g) a excepción del tratamiento con 75 mg/Kg FBs + manano oligosacáridos (T7) que fue significativamente menor ($p < 0.05$).

Tabla 11 Peso promedio de órganos a los 7 días post-exposición a fumonisinas en pollos de engorda.

T	Hígado (g)		Riñón (g)		Corazón (g)		Bazo (g)		Bolsa de Fabricio (g)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
T1	20.8	3.95	5.80 a	0.29	6.16 a	0.59	1.06	0.16	1.20	0.21
T2	11.76	5.41	5.00 a	0.77	4.63 a	1.11	1.10	0.08	1.03	0.12
T3	18.60	0.53	5.96 a	0.70	5.86 a	0.12	1.26	0.12	1.13	0.26
T4	17.73	1.21	6.06 a	1.20	2.76 b	1.30	1.10	0.01	1.26	0.007
T5	17.83	0.38	6.46 a	0.88	5.73 a	0.20	1.23	0.20	1.66	0.16
T6	15.8	2.97	4.53 b	1.36	5.73 a	0.65	1.23	0.16	1.03	0.39
T7	20.86	1.51	6.83 a	0.12	5.60 a	1.08	1.23	0.20	1.43	0.24
T8	19.40	0.29	7.06 a	0.49	5.90 a	0.77	1.10	0.14	1.40	1.98
T9	19.60	2.35	7.50 a	0.28	5.33 a	0.75	1.26	0.04	1.16	0.12

T1: control, T2: control + clinoptilolita, T3: Manano oligosacáridos, T4: 75 mg/Kg fumonisinas, T5: 75 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos, T7: 100 mg/Kg fumonisinas, T8: 100 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T9: 100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos.
Las literales indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre tratamientos

La tabla 12 muestra los pesos de los órganos registrados a los 21 días post-exposición. El análisis estadístico permitió encontrar sólo diferencia estadística ($p < 0.05$) en los pesos de la bolsa de Fabricio, correspondiendo los menores pesos a los que recibieron los tratamientos que incluían 100 mg/Kg de FBs (T7) y 100 mg/Kg de FBs + clinoptilolita (T8), los valores oscilaron entre 0.86 y 0.76 g respectivamente, sin embargo fueron similares estadísticamente al tratamiento control (1.03 g). Respecto a los pesos de los otros órganos no mostraron diferencia estadística ($p > 0.05$).

Tabla 12. Peso promedio de órganos a los 21 días post-exposición a fumonisinas de los pollos de engorda.

T	Hígado (g)		Riñón (g)		Corazón (g)		Bazo (g)		Bolsa de Fabricio (g)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
T1	43.33	5.83	12.53	1.22	9.30	1.96	2.43	0.75	1.03 b	0.04
T2	48.10	10.15	15.63	2.93	12.10	2.59	2.43	1.34	1.30 a	0.49
T3	43.46	4.84	10.96	2.59	11.53	0.75	1.60	0.29	1.10 a	0.14
T4	45.96	2.90	13.66	0.80	10.16	0.62	2.10	0.14	1.33 a	0.28
T5	43.53	2.84	12.53	0.41	8.83	1.54	2.10	0.29	2.00 a	0.48
T6	43.50	2.04	13.83	1.24	11.63	1.21	2.20	0.58	1.50 a	0.40
T7	37.53	5.06	11.00	0.00	8.06	0.82	2.70	0.35	0.86 b	0.26
T8	38.70	11.83	10.00	1.62	8.53	1.13	2.70	0.84	0.76 b	0.16
T9	41.70	2.27	11.83	0.84	8.53	0.84	2.70	1.48	1.36 a	0.09

T1: control, T2: control + clinoptilolita, T3: Manano oligosacáridos, T4: 75 mg/Kg fumonisinas, T5: 75 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos, T7: 100 mg/Kg fumonisinas, T8: 100 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T9: 100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos. Las literales indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre tratamientos.

7.9. Estudio histopatológico

La evaluación histopatológica de hígado y riñón de pollo de engorda por efecto de los diferentes tratamientos utilizados en la prueba experimental se muestra en las tablas 13 y 14.

Hígado: se observó el arreglo parenquimatoso del tejido con definición precisa de los grupos de hepatocitos con núcleos de aspecto normal y espacios definidos, se identificaron las venas centrolobulillares con límites claros. Se observaron los espacios o canalículos biliares bien definidos.

Riñón: Se observó tanto para corteza como para médula renal una estructura normal; glomérulos abundantes con espacio de Bowman bien definido circundando el penacho glomerular, así como túbulo proximales y distales con lumen permeable y células definidas.

Nota: Se encontraron cantidades moderadas de eritrocitos entre las estructuras de ambos tejidos, sin que este indique ninguna anomalía, atribuido al tipo de fijación.

Segunda etapa (7 días post-exposición):

Hígado: En los grupos control se aprecia el arreglo parenquimatoso del tejido con definición precisa de los grupos de hepatocitos con núcleos de aspecto normal y espacios definidos, se identifican las venas centrolobulillares con límites claros. Se observan los espacios o canalículos biliares bien definidos (Figura 4).

Al analizar los diferentes grupos experimentales se encontraron diversos hallazgos patológicos de tipo moderado a severo; los grupos que recibieron fumonisinas presentaron niveles severos de necrosis focal, evidente inicialmente por picnosis, degeneración turbia y en menor proporción edema intersticial (Figura 5)

Riñón: En los grupos control se observó tanto para corteza como para médula renal una estructura normal; glomérulos abundantes con espacio de Bowman bien definido circundando el penacho glomerular, así como túbulo proximales y distales con lumen permeable y células

definidas (Figura 6). En la medula renal se observaron los haces cónicos de túbulo colectores de aspecto normal.

Tabla 13. Histopatológicos de hígado y riñón al día 7 post-exposición a fumonisinas en los pollos de engorda.

Grupo	N	Hígado	Riñón
T1	3/3	Congestión moderada	Congestión moderada
T2	1/3	Sin modificación	Degeneración turbia moderada, pérdida de arreglo tisular incipiente, congestión moderada
T3	1/3	Sin modificación	Necrosis focal incipiente y pérdida de integridad celular incipiente
T4	1/3	Necrosis focal moderada, edema intersticial incipiente	Necrosis focal tubular y tumefacción glomerular moderados
T5	1/3	Congestión severa, necrosis focal moderada, edema intersticial incipiente	Necrosis focal y tumefacción glomerular
T6	1/3	Necrosis focal moderada	Necrosis focal y tumefacción glomerular moderada
T7	1/3	Necrosis focal moderada	Necrosis focal y tumefacción glomerular moderada
T8	1/3	Necrosis focal moderada	Necrosis focal y tumefacción glomerular moderada
T9	1/3	Sin modificación	Sin modificación

T1: control, T2: control + clinoptilolita, T3: Manano oligosacáridos, T4: 75 mg/Kg fumonisinas, T5: 75 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos, T7: 100 mg/Kg fumonisinas, T8: 100 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T9: 100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos. Las literales indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre tratamientos.

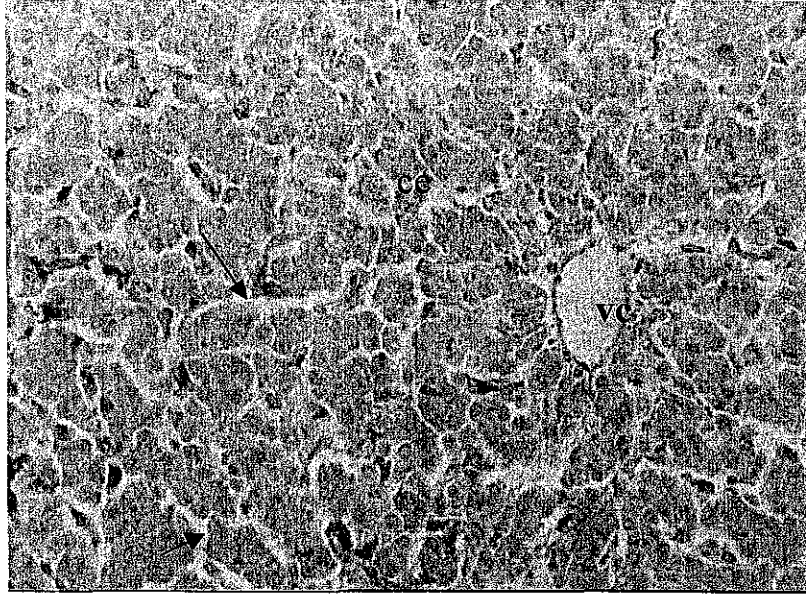


Fig. 4 Fotomicrografía de hígado de pollo del grupo control, se observa el tejido con citóarquitectura normal, grupos irregulares de hepatocitos (ce), espacios sinusoidales (flechas) y vena centrolobulillar (vc). Objetivo 20X, tinción HE.

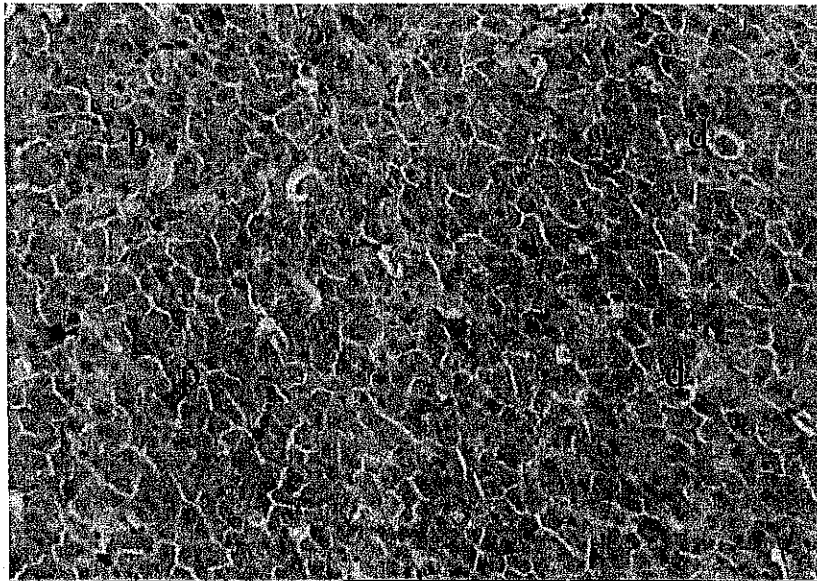


Fig. 5 Fotomicrografía de hígado de pollo del grupo fumonisinás 100 ppm, se observa necrosis celular, evidente por picnosis (p) y degeneración de hepatocitos (d). Objetivo 20X, tinción HE.

Tabla 14. Histopatológicos a los 21 días post-exposición a fumonisinas en hígado y riñón de pollo de engorda

Grupo	N	Hígado	Riñón
T1	3/3	Necrosis focal y pérdida de integridad celular incipientes	Necrosis focal incipiente
T2	3/3	Perdida de citoarquitectura incipiente	Necrosis focal incipiente
T3	3/3	Perdida de citoarquitectura incipiente	Necrosis focal incipiente
T4	3/3	Perdida moderada de citoarquitectura	Perdida moderada de cito-arquitectura
T5	3/3	Sin modificación	Sin modificación
T6	3/3	Necrosis focal incipiente	Sin modificación
T7	3/3	Perdida moderada de citoarquitectura	Perdida moderada de citoarquitectura
T8	3/3	Sin modificación	Necrosis focal incipiente, degeneración turbia incipiente.
T9	3/3	Perdida de integridad y degeneración turbia incipiente	Perdida integridad y degeneración turbia incipiente

T1: control, T2: control + clinoptilolita, T3: Manano oligosacáridos, T4: 75 mg/Kg fumonisinas, T5: 75 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T6: 75 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos, T7: 100 mg/Kg fumonisinas, T8: 100 mg/Kg fumonisinas + clinoptilolita, T9: 100 mg/Kg fumonisinas + manano oligosacáridos. Las literales indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre tratamientos.

Al analizar los diferentes grupos experimentales se encontraron diversos hallazgos patológicos de tipo moderado a severo; los grupos que recibieron FBs presentaron niveles severos de necrosis focal (picnosis marcada), degeneración celular (pérdida de integridad celular) y tumefacción glomerular (Figura 7), estos resultados deben tomarse con reserva, ya que los hallazgos patológicos severos solo se observaron en 1 de las 3 muestras.

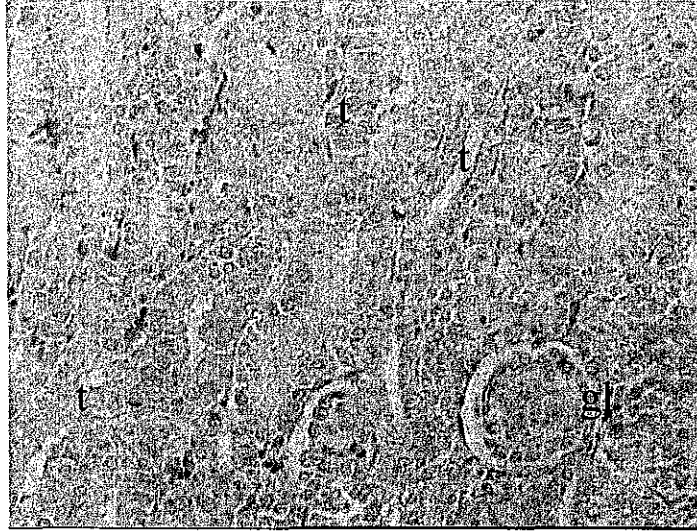


Fig. 6 Fotomicrografía de tejido renal de pollo del grupo control donde se observa la estructura normal, glomérulo (gl) con espacio definido, así como cortes transversales de diversos tubulos(t) con células epiteliales normales. Objetivo 20X, tinción HE.

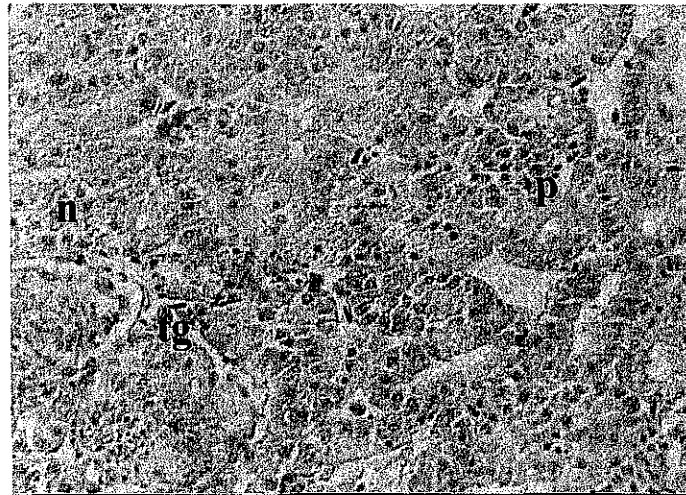


Fig. 7 Fotomicrografía de riñón de pollo del grupo Fumonisinás 100 ppm. Se observa necrosis celular (n), picnosis (p) y tumefacción glomerular (tg). Objetivo 20X, tinción HE.

Tercera etapa (21 días post-exposición a fumonisinas):

Hígado: En los grupos control y experimental se identifica ligera picnosis focal y leve degeneración turbia (atribuible probablemente al manejo de las muestras). El tejido en términos generales muestra un aspecto normal para todos tratamientos.

Riñón: En los grupos control y experimental se identifican pequeñas zonas picnóticas y leve degeneración turbia de tipo localizada (atribuible probablemente al manejo de las muestras). El tejido presenta un aspecto normal a nivel de corteza y médula renal en todos los grupos.

VIII. DISCUSIÓN

8.1. Determinación “in vitro” del nivel de inclusión de la clinoptilolita

Entre las medidas de control para reducir los efectos tóxicos de las micotoxinas, se ha propuesto el uso de adsorbentes naturales de origen mineral, en especial las arcillas del tipo de los aluminosilicatos, los cuales han sido estudiados por más de 20 años (Davison y col., 1987; Masimango y col., 1978; Mumpton y Fishman, 1977). El uso de estos adsorbentes mezclados en las raciones, ha permitido disminuir el impacto de dichas toxinas en los parámetros productivos y a la salud (Kubena, 1999; Phillips, 1988; Ramos y Hernandez, 1997).

La clinoptilolita, que estructuralmente pertenece al grupo de la zeolitas, presenta características físico-químicas especiales, tales como, capacidad de intercambio catiónico (150 meq/100g), volumen de poro ($0.34 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$) y área superficial, lo que le permite ser considerada una arcilla con un alto grado de adsorción (Harvey y col., 1993).

La capacidad de adsorción de fumonisinas por la clinoptilolita fue elevada, considerándose aceptable al ser una micotoxina altamente polar caracterizada por una estructura de 20 carbonos y dos grupos de ácido tricarbóxicos con uno a tres grupos hidroxilo y un grupo primario amino (Bezuidenhout y col., 1988) esto las hace estables bajo condiciones ácidas o neutras.

La evaluación de la capacidad de adsorción de FB_1 en estudios previos realizados con zeolitas, mostraron resultados similares a los encontrados en el presente estudio, observándose 80% de adsorción a un pH de 4 y de 25% a pH 2, mientras que a pH 6 no se encontró adsorción de fumonisinas (Chiachiera y col., 2000).

Resultados obtenidos por Dwyer y col. (1997) al probar la eficiencia “in vitro” de una clinoptilolita y de dos filosilicatos utilizando el índice de adsorción, mostraron que el mejor índice de adsorción correspondió al filosilicato ácido (0.93) y el menor (0.10) a la clinoptilolita.

8.2. Evaluación del uso de adsorbentes

8.2.1. Contaminación natural por micotoxinas en las dietas

En el presente estudio se detectó contaminación natural por AFs y OA, en las dietas experimentales aunque los niveles fueron relativamente bajos en todos los tratamientos evaluados.

Numerosos estudios sobre la contaminación natural de AFs y ZEA, en alimentos destinados al consumo humano y animal han sido informados en Europa, America del Norte, Asia y Japón (Abramson y col., 1991; Scott y col., 1997).

Magnoli y col. (2002) encontraron contaminación con AFB₁, ZEA y DON en dietas de pollos de engorda. AFB₁ fue la micotoxina de mayor incidencia (52.5%) con niveles que variaron entre 10 a 123 ng/g, mientras que 16% de las muestras resultaron contaminadas con ZEA (rango de 327 a 5,850 ng/g) y el 8.6% con DON (rango de 240-410 ng/g). Por otro lado el 97% de las muestras mostraron niveles de FBs que variaron entre 136 a 4,260 ng/g.

En Africa y Argentina se detectó contaminación en el 100% de muestras de maíz destinados a consumo animal, los niveles promedio de FB₁ fueron de 2.35 µg/g y 0.31 µg/g respectivamente (Stockentrom y col., 1998). Jindal y col. (1999) en un estudio realizado en la India detectaron contaminación con FBs en 84% de muestras de alimento balanceado para aves, los niveles oscilaron entre 1 y 30 µg/g.

En otros países se ha informado la incidencia simultánea de tricotecenos, ZEA, AFs y FBs en maíz y en alimentos a base de maíz (Li y col., 1999; Scudamore y col., 1997). Dutton y Kinsey (1995) observaron que el 4.8% de los insumos para aves contenían AFB₁ en niveles de 20 ng/g; 84.4% contenían FB₁ con niveles que variaron desde 200 a 1000 ng/g mientras que DON no se detectó en ninguna de las muestras analizadas. En general, se pudo demostrar que el 58% de las muestras de alimentos a base de maíz estaban contaminadas con una o varias micotoxinas.

De acuerdo con los estudios realizados sobre la contaminación natural con micotoxinas en alimentos de humanos y animales, se concluye que es frecuente encontrar co-ocurrencia de las diferentes micotoxinas en el alimento de pollos de engorda, además de que los niveles son variables, por lo que se recomienda el monitoreo periódico en las granjas de aves de corral.

8.2.2. Efectos en parámetros productivos

La evaluación de los parámetros productivos no presentó diferencia estadística entre grupos, lo que indica que los niveles de FBs evaluados no fueron suficientes para afectar el comportamiento de los pollos. Estos resultados son comparables con los mostrados por Weibking y col. (1993) quienes no observaron modificaciones en el consumo de alimento y en la ganancia de peso de los pollos, por el consumo de 75 mg de FBs/Kg, aunque se apreció un ligero incremento en la conversión alimenticia durante la primera semana de la prueba. Ledoux y col. (1999) estudiaron los efectos de la inclusión de 50, 100 y 200 mg/Kg de FB₁, encontrándose que todos los grupos que recibieron fueron semejantes con el grupo control. Estudios previos realizados por Ledoux y col. (1992) encontraron disminución lineal en la ganancia de peso en pollos alimentados con niveles de FB₁ de 100 a 400 mg/Kg. En dicho estudio se apreció disminución en la digestibilidad de materia seca relacionada con diarrea, lo cual pudo ser resultado de los altos niveles de inclusión de material contaminado con *F. verticillioides* en las dietas (10%), en tanto que los estudios realizados por Ledoux y col. (1999) y Weibking y col. (1993) incluyeron niveles menores del 5% de material contaminado con *F. verticillioides*, no observándose diarreas ni alteraciones en el comportamiento de los animales, además en estos estudios como en el presente no se observó mortalidad a consecuencia del consumo de FBs.

Por otra parte, se tienen reportes de investigaciones sobre los efectos combinados de FBs con otras micotoxinas, observándose alteraciones sobre parámetros productivos. Kubena y col. (1997) evaluaron la inclusión de FB₁ (300 mg/Kg), toxina T-2 (5 mg/Kg) y DON (15 mg/Kg) en dietas pollos por periodos de 21 días. El efecto combinado de FB₁ + toxina T-2 mostró reducción de la ganancia de peso (GDP), disminución en el consumo de alimento, baja en la eficiencia alimenticia y un incremento en la mortalidad. El efecto combinado de FB₁ + DON

solo mostró disminución en la GDP y menor eficiencia alimenticia. La disminución de la GDP en la primera combinación pudo describirse como aditiva, mientras que en la segunda combinación se consideró menor que aditiva.

Investigaciones recientes desarrollados por Ledoux y col. (2003), reportaron el efecto individual y combinado de FB₁ con moniliformina en niveles de 100 y 200 mg/Kg en la alimentación de pollos de engorda. El efecto individual de moniliformina (200 mg/Kg) incrementó la mortalidad en un 65%, mientras que la mayor inclusión de FB₁ solo la incrementó en 10%. Si bien la FB₁ sola no afectó los parámetros productivos, el efecto combinado con moniliformina dió como resultado disminución en el consumo de alimento y ganancia diaria de peso, lo que ocurrió a partir de los 100 mg/Kg de moniliformina, efecto previamente reportado en pavos por Bermudez y col. (1997).

8.2.3. Actividad enzimática de AST, ALT y niveles de proteínas totales en suero

Con relación a las determinaciones en suero, se apreció que el incremento de la actividad enzimática de AST al día 7 días post-exposición, en los tratamientos con 75 mg/Kg de FBs y 75 mg/Kg + manano oligosacáridos respecto al grupo control se debió posiblemente a una alteración del hígado durante la exposición a dicha micotoxina, no observándose un efecto protector de los adsorbentes incluidos en los tratamientos experimentales. Nuestros resultados son similares a los reportados por Manning y Wyt (1990) quienes reportan que los valores para la actividad de AST se elevaron en aves intoxicadas con AFs con respecto al grupo control. Efectos similares se han observado en ratones con dietas de FB₁ (10 µg/g), AFB₁ (10 ng/g) y una mezcla de FB₁ + AFB₁ (10 µg/g + 10 ng/g) mostrando un incremento significativo en la actividad de AST en las dietas con FB₁ y en las dietas con mezcla de FB₁ + AFB₁, los niveles fueron de 151 UI/L y 212.33 UI/L respectivamente (Casado y col, 2000). Resultados similares fueron reportados por Marín y col. (2003) quienes observaron un aumento significativo en la concentración plasmática de AST y ALT al incluir 80 µg/g de FB₁ y 500 ng/g de AFB₁ en las dietas del pollo de engorda.

La actividad enzimática de AST a los 21 días post-exposición no mostró cambios entre tratamientos, lo cual puede ser explicado posiblemente a que existe un proceso de recuperación del daño y función producido por efectos de la micotoxina, ya que los animales fueron expuestos a FBs sólo durante una semana, efecto previamente reportado por otros investigadores que observaron recuperación de la actividad enzimática de AST y ALT al retiro del alimento contaminado (Kubena y col., 1995). Con respecto a la actividad enzimática de ALT, ésta no mostró alteraciones tanto a los 7 y 21 días posteriores al tratamiento con FBs, lo cual posiblemente es indicativo de que el daño del tejido no ocurrió de manera severa.

En relación a la concentración de proteínas totales se observó que hubo una disminución al día 7 post-exposición en el grupo que recibió 75 mg/Kg de FBs + clinoptilolita con respecto al grupo control. Resultados similares fueron reportados por Stanley y col. (1993) quienes expusieron pollos a dosis experimentales de AFB₁ en el alimento (5 mg/Kg) y observaron una disminución de los niveles de proteínas séricas (control: 3.49 g/dL y grupo con AFB₁: 1.62 g/dL). Sin embargo en estudios realizados con ratones en donde utilizaron dietas contaminadas con niveles de FB₁, AFB₁ de manera individual y combinadas, no se observaron cambios en la concentración de proteínas totales en suero a los 30, 60 y 90 días de exposición (Casado y col., 2000). Resultados similares fueron reportados por Aravind y col. (2003) en pollo de engorda al utilizar raciones contaminadas con diferentes micotoxinas (AFB₁: 168 ng/g, OA: 8.4 ng/g, ZEA: 54 ng/g y toxina-T2: 32 ng/g) con y sin manano oligosacáridos al 0.05 %, sin mostrar alteración de la concentración de proteínas totales en suero sanguíneo.

8.2.4. Relación SA/SO en suero de pollos

La determinación de los biomarcadores SA y SO en suero mostró ser un excelente método de análisis para evaluar la exposición a FBs, puesto que demostró que a niveles bajos de FB₁ pueden ser detectadas alteraciones de la relación SA/SO previo a la manifestación de lesiones severas en los tejidos.

El estudio de biomarcadores de daño biológico por efecto de micotoxinas, ha sido estudiado para relacionar el consumo de FB₁ con efectos tóxicos a la salud, las investigaciones están enfocadas a marcadores moleculares en fluidos corporales y tejidos (Turner y col., 1999). Los

avances relacionados con las FBs se fundamentan en el mecanismo de daño a nivel celular, el cual involucra la inhibición de la enzima clave (N-aciltransferasa de esfinganina/esfingosina) del metabolismo de esfingolípidos (Merrill y col., 1996). La alteración ocasiona el incremento de los niveles SA afectando la relación SA/SO, biomarcador de la exposición a FBs, se ha documentado que el incremento de esta relación es indicativo del daño primario de dichas FBs (Solfrizzo y col., 1997; Qiu y Liu, 2001; Westhuizen y col., 1999) previo a la manifestación de las lesiones.

Los niveles de SA en el presente estudio aumentaron significativamente ($p < 0.05$) el día 7 post-exposición en los grupos que recibieron dietas que incluyeron FB_1 particularmente en la que se incluyó 100 mg/Kg, esto influyó en que la relación SA/SO aumentara en dichos grupos, siendo esta mayor a 1, valor considerado de riesgo toxicológico (Riley, 1994). En condiciones normales los niveles de SA son menores a SO en una relación 1:4 (Hannun y Bell, 1989) lo que permite que la relación SA/SO se conserve en niveles menores a 1. Riley (1994) mostró que en animales alimentados con niveles < 1 mg/Kg de FB_1 la relación SA/SO en suero fue de 0.34 en ratas, 0.20 en ponies y de 0.18 en cerdos. Si bien se ha reportado que la alteración del metabolismo de esfingolípidos pudiera ser ocasionado por otros agentes exógenos (Chatterjee y col., 1986), ninguno de estos inhiben específicamente a la enzima N-aciltransferasa de esfinganina, por lo que la inhibición de la biosíntesis de SO requiere de una alteración persistente en los niveles de SA libre que pudiera ocurrir si la reacilación de la esfingosina fuera dañada como es el caso con FBs (Wang y col., 1992).

En el presente estudio la relación SA/SO fue mayor a 1 al día 7 post-exposición en los tratamientos que incluyeron FB_1 , mientras que al día 21 los valores permanecieron por abajo de 1, esto posiblemente puede atribuirse al retorno de los niveles normales de SA y SO a nivel celular, efecto previamente observado en estudios efectuados con ratas expuestas a FBs (Castegnaro y col., 1996). La disminución del complejo esfingolípido resultante de la inhibición de la biosíntesis por la FB_1 , y la acumulación de esfinganina pueden ser la causa de las patologías observadas en las toxicosis por FB_1 , debido a que los esfingolípidos están involucrados en la regulación de los receptores de la membrana celular, del intercambio de iones y de otros sistemas vitales para la función y supervivencia celular (Merrill y col., 1996).

El incremento de la relación SA/SO ha sido observado en otros estudios que involucraron diversas especies animales así como en humanos. Shephard y col. (1996) reportaron elevación significativa en monos vervet expuestos a material cultivado con *F. verticillioides*, en dicho estudio la relación SA/SO fue de 1.72 en los animales que recibieron dosis de 300 µg de FB₁/Kg de p.v. y de 2.57 en los que recibieron 800 µg de FB₁/Kg de p.v. Cabe destacar que los estudios en animales en los que se determinó la relación SA/SO incluyeron niveles elevados de FB₁ como lo son los efectuados en ponies donde se adicionaron niveles de 22,000 y 44,000 µg FB₁/Kg de alimento (Wang y col., 1992), en cerdos: 1,500 µg FB₁/Kg de p.v./día (Haschek y col., 1993); en conejos: 1,000 µg FB₁/Kg de p.v /día (Gumprecht y col., 1995) y en ratas: 13,600 µg FB₁/Kg de p.v/día (Voss y col., 1995).

Weibking y col. (1993) reportaron un aumento en los niveles de SA en suero sanguíneo y en la relación SA/SO en pollo de engorda que consumieron dietas contaminadas con FB₁ (75, 150, 225, 300, 375, 450 y 525 mg/Kg) efecto observado en el presente estudio a partir de los niveles más bajos (75 mg/Kg), por lo que se corroboró la sensibilidad que ofrece el uso de los biomarcadores SA y SO como indicadores de la exposición a FBs (Solfrizzo y col., 2004).

8.2.5. Proteínas y glutatión en hígado y riñón

Cuando se cuantificó la concentración de proteínas totales hepáticas y renales como un parámetro indicativo del funcionamiento e integridad de estos órganos, se observó que la inclusión de FBs a 75 y 100 mg/Kg en las dietas que recibieron los pollos no fueron suficientes para ocasionar un efecto negativo sobre los niveles de proteínas en hígado y riñón, los cuales permanecieron con niveles similares al control, dichos resultados concuerdan con lo observado en la detección de proteínas en suero.

Estudios previos han mostrado inhibición de la síntesis de proteínas y cambios en los niveles de proteínas plasmáticas y lipoproteínas en hígado (Beer y col., 1992; Kubena y col., 1995; Quezada y col., 1995). Yoo (1977) encontró que AFB₁ tiene efecto inhibitor de la síntesis de proteínas ya que actúa sobre el ARN transcripcional, mientras que las FBs no se relacionan con la síntesis proteica al mostrar un mecanismo de acción distinto a las AFs.

Respecto a los resultados observados en los niveles de glutatión en hígado, se apreció aumento de la concentración a los 7 días post-exposición a 100 mg/Kg de FBs, aunque los niveles de GSH son comparables estadísticamente al control, mientras que al día 21 post-exposición todos los grupos que fueron expuestos a FBs con y sin adsorbentes mostraron altos niveles de GSH.

Se conoce que el GSH confiere protección a las células por tener alta reactividad con compuestos electrofílicos para formar GSH-conjugados, los cuales posteriormente son metabolizados y excretados por la vía del ácido mercaptúrico en la orina y la bilis (Sies y Ketterer, 1988).

Los niveles de GSH en mamíferos oscilan en un intervalo de 5 a 8 $\mu\text{mol/g}$ de tejido (Chanda y Mehendale, 1996), mientras que el GSH hepático en pollos de engorda mostraron valores entre 1.26 a 4.19 $\mu\text{moles/tejido}$ (Beer y col., 1992; Wang y col., 1997). Los estudios de Murphy y King (1990) sugieren que a diferencia de los niveles de GSH de los mamíferos, las bajas concentraciones de GSH en aves son una consecuencia posiblemente del incremento de su demanda para el crecimiento y desarrollo muscular debido a que los pollos han sido seleccionados por ingeniería genética para un rápido desarrollo, para lo cual requieren hormonas tiroideas (Fernández y col., 1991).

Las evidencias mostradas por Mgbodile y col. (1975) permitieron confirmar que el incremento de los niveles de GSH en el tejido hepático realizan un papel muy importante para ofrecer la protección contra los efectos tóxicos de la AFB₁, coincidiendo con los hallazgos de Liu y col. (1988), demostrándose que la conjugación de la micotoxina con el GSH es una vía muy importante de detoxificación.

Los niveles de GSH renal en pollos han sido reportados en un intervalo de 4.7 a 6.7 $\mu\text{mol/g}$ de tejido (Beers y col., 1992), esto es debido a que el riñón posee una enorme capacidad de sintetizar y degradar GSH y por consiguiente la disminución de su concentración es una respuesta bioquímica a la presencia de varios nefrotóxicos (Whiting, 1985). Por otra parte, Beers y col. (1992) mostraron que los niveles de GSH renal en aves fueron mayores que en

hígado, lo cual pudiera explicar en parte las diferencias del metabolismo de xenobióticos entre los mamíferos y las aves.

8.2.6. Efecto de las fumonisinas sobre órganos

Los efectos observados en los pesos absolutos de los órganos no mostraron alteraciones que fueran consistentes de manera relacionada con la inclusión de FBs a los niveles de 75 y 100 mg/Kg, ya que pudo apreciarse indistintamente menores pesos en los tratamientos que incluyeron fumonisinas con y sin adsorbentes y en algunos casos fueron semejantes al control, esto posiblemente pudo ser atribuido al número reducido de observaciones.

Estudios relacionados con el desafío de FBs en pollo de engorda reportaron aumento del peso de hígado y riñón así como de páncreas y molleja (Kubena y col., 1997) cuando se utilizaron raciones contaminadas con FB₁, toxina-T2 y DON. Ledoux y col. (2003) en raciones contaminadas con FBs y moniliformina observaron una cardiomegalia en los pollos expuestos a moniliformina en comparación con el grupo control y con los pollos que consumieron las raciones contaminadas con FB₁. Además de apreciarse aumento del peso del hígado y riñones; en el grupo que incluyó 200 mg de FB₁/Kg se encontró aumento en el peso del hígado. Efectos similares fueron observados por Bermudez y col. (1997) y Weibking y col. (1994) cuando utilizaron raciones contaminadas con 75 mg de FB₁/Kg observándose un aumento significativo en el peso de los órganos en pavos al incluir 200 mg de FB₁/Kg en la ración por 21 días y 15 mg de FB₁/Kg durante 18 semanas. Estudios que evaluaron los efectos combinados por micotoxinas (AFs; 168 ng/g, OA: 8.4 ng/g, ZEA: 54 ng/g y toxina-T2: 32 ng/g) en raciones de pollo de engorda contaminadas en forma natural, mostraron un aumento en el peso relativo del hígado de 24.9% y en la molleja de 12% comparado con el de los controles (Aravind y col., 2003). Contrariamente, estudios de toxicidad crónica (112 días) con la inclusión de FB₁ (100 a 200 mg/Kg) en dietas de gallinas de postura no mostraron alteración en el peso del hígado (Kubena y col., 1999). Resultados similares fueron los reportados por Henry y col. (2000) en estudios con pollo de engorda donde se evaluaron 20, 40 y 80 mg de FB₁/ Kg purificada.

Swamy y col. (2004) no reportan diferencia estadística en la alteración de los pesos de hígado, riñones, bazo o de la bolsa de fabricio, por efecto de la inclusión de granos contaminados con DON, ácido fusárico, ZEA y 15-acetildeoxinivalenol, tanto a niveles bajos o con niveles altos en pollo de engorda: Efectos similares fueron reportados por Broomhed y col. (2002) al utilizar raciones con base maíz-soya contaminados con material de cultivo de *F. moniliforme* que contenía 25 y 50 mg de FBs/Kg de alimento.

De acuerdo a los estudios previamente presentados los efectos sobre órganos pueden ser variables dependiendo de los niveles de inclusión de las micotoxinas, de la combinación por ciertas micotoxinas o bien por el periodo de exposición.

Por otra parte, en el presente estudio la evaluación de los dos adsorbentes permitió determinar que bajo las condiciones experimentales utilizadas, los manano oligosacáridos mostraron tener mejor efecto protector sobre los pollos de engorda, efecto que ha sido demostrado en otros estudios realizados en pollos (Aravind y col., 2003) y en cerdos (Swamy y col., 2003). Además el efecto benéfico sobre los parámetros productivos puede ser atribuido a la habilidad para bloquear la colonización de patógenos en el tracto gastrointestinal (Olsen, 1995) y al efecto inhibitor de la depleción de antioxidantes en hígado (Dvorska y Surai, 2001).

8.2.7. Estudio Histopatológico

Los hallazgos histopatológicos encontrado en el presente trabajo para hígado fueron: congestión severa, necrosis focal moderada, edema intersticial y desorganización tisular, lo que coincide parcialmente con trabajos realizados tanto en pollos (Weibking y col., 1993), efecto observado en otras especies por la exposición a micotoxinas (Casado y col., 2000; Riley y col., 1992).

En pollos, al suministrar niveles de 225 a 525 mg FB₁/Kg dieta, se encontró aumento en el peso de hígado y diversas lesiones severas como proliferación periportal de granulocitos, necrosis hepática focal e infiltración de macrófagos (Weibking y col., 1993). En cerdos en los que se encontraron daño hepático (necrosis hepática incipiente, inflamación moderada y

desorganización de hepatocitos) por el consumo de 101 y 175 ppm de FB₁ (Riley y col., 1992). En ratones cuando se proporcionaron niveles de 10 ppm de FB₁ y 10 ppb AFB₁ durante 60 días, encontraron infiltración y necrosis en el 50% de lo animales (Casado y col., 2000).

Cuando se analizó el efecto de las micotoxinas sobre daño renal, los reportes encontrados no muestran consistencia en los resultados. Diversos autores no encuentran daño renal en pollos al suministrar diferentes micotoxinas (Broomhead y col., 2002., Weibking y col., 1993). Algunos autores refieren aumento de peso de riñón como Ledoux y col. (2003) y Kubena y col. (1997).

En el presente trabajo se encontraron los siguientes daños renales: necrosis focal tubular y tumefacción glomerular con características de incipiente a moderada. En la literatura algunos autores refieren cambio renal por la presencia de micotoxinas, Ledoux y col. (2003) encontraron mineralización tubular renal en pollos cuando fueron expuestos a una combinación de FB₁ (200 mg/Kg) y moniliformina (200 mg/Kg). Casado y col. (2000), refieren solo congestión y hemólisis en riñón de ratones cuando fueron expuestos por periodo prolongado (90 días) a una combinación de micotoxinas: 10 ppm de FB₁ y 10 ppb AFB₁.

Los hallazgos más importantes encontrados en el presente trabajo refieren un daño histológico de moderado a severo en muestras de hígado de pollos que recibieron o estuvieron expuestos al consumo de FBs a nivel de 75 o 100 mg/Kg, sin que al parecer la presencia o incorporación de clinoptilolita ejerciera un efecto protector sobre dicho metabolito, en cambio la presencia del adsorbente mananologosacarido disminuyó aparentemente algunos de los daños principalmente en el grupo de 100 mg/Kg de FBs.

En la literatura son escasos los trabajos que han utilizado adsorbentes en dietas con FBs, sin embargo existen algunos investigadores que los han incluido en dietas contaminadas con otras micotoxinas. Miazzo y col. (2000), al utilizar zeolitas al 1% como adsorbentes de AFB₁ (2.5 mg/kg) no encontraron efecto protector, resultados que coinciden con la respuesta observada en nuestro trabajo en los grupos con clinoptilolita, ya que este último comparte características fisicoquímicas (Huwig y col., 2001).

En otros trabajos se han probado diversas sustancias como protectores de la función hepática, encontrándose disminución de los daños hígado y riñón causados por la presencia de AFB₁ a una concentración de 3 mg/kg de N-acetil cisteína a 800 mg/Kg de alimento (Valdivia y col., 2001).

García (2002) estudió el efecto de la inclusión de diversos aluminosilicatos y paredes celulares de *S. cerevisiae* en las dietas de pollos engorda contaminadas con cultivos de *Aspergillus ochraceus* y *F. tricinctum* productoras de OÁ y toxina T-2, encontrando lesiones en hígado, principalmente de tipo crónico, entre las lesiones se observó hiperplasia de conductos biliares. Los cambios en riñón fueron observados en células tubulares, apreciándose necrosis por efecto de OA, dichas lesiones fueron observadas tanto en los grupos control como en las que se incluyeron los adsorbentes.

Considerando los efectos de las FBs en aves y la posible acción sinérgica con otras micotoxinas, demostrada por otros investigadores (Kubena y col., 1993; Ledoux y col., 2003), y puesto que es frecuente la co-ocurrencia de las micotoxinas en el alimento de consumo animal, deben realizarse nuevos estudios que permitan establecer regulaciones de los niveles de FBs presentes en los alimentos para animales.

El uso de los adsorbentes, tanto clinoptilolita como los manano oligosacáridos, bajo los niveles de FBs estudiados, no pudieron demostrar un efecto protector al no presentarse diferencia estadística entre tratamientos, sin embargo destacó el grupo que solo recibió manano oligosacáridos, ya que mostró los mejores parámetros productivos.

De acuerdo a los hallazgos del presente estudio pudiera ser recomendado ampliamente el uso de los biomarcadores SA y SO como indicadores de la exposición a FBs, los cuales son detectados con alta sensibilidad mediante cromatografía de líquidos de alta precisión, pudiendo ser una herramienta de gran utilidad en las explotaciones pecuarias que permita prevenir los problemas de micotoxicosis y reducir las pérdidas económicas a los productores.

IX. CONCLUSIONES

1. La clinoptilolita adsorbe con eficiencia fumonisina B₁ a una concentración de 75 mg y pH 4, lo que permitió establecer como inclusión en la ración de pollo de engorda niveles de 2.5 Kg/tonelada de alimento.
2. La inclusión de fumonisinas a 75 y 100 mg/Kg en raciones para pollo de engorda no afectó los parámetros productivos en ninguna de las etapas estudiadas.
3. El uso del adsorbente manano oligosacáridos de manera independiente, en las raciones del pollo de engorda permitió obtener los mejores parámetros productivos de la prueba.
4. La actividad enzimática de AST fue más representativa del daño parcial producido en hígado por las fumonisinas, mientras que la ALT no mostró ser buen indicador de daño.
5. La relación SA/SO, demostró ser un biomarcador sensible de la exposición a fumonisinas en pollos de engorda.
6. El estudio histopatológico de los órganos evaluados permitió observar daño celular de moderado a severo por efecto del consumo de fumonisinas.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abramson D. (1991). Development of molds, mycotoxins and odors in moist cereals during storage. En: Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Chelkoswski J. (ed). *Developments in Food Science*. Elsevier, Amsterdam., pp. 119-147.

Abramson D., Mills J. T., Sinha R. N. (1990). Mycotoxin production in amber durum wheat stored at 15 and 19% moisture content, *Food Addit. Contam.* 7:617-627.

Aravind K. L., Patil V. S., Devegowda G., Umakantha B., Ganpule S. P. (2003). Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poult. Sci.* 82:571-576.

Austic R. E., Nesheim M. C. (1990). Poultry Production 13 th, edition, by Lea & Febiger.
Ávila G. E. (1990). Alimentación de las aves. 2ª ed. Trillas, México.

Basappa S. C., Shantha T. (1996). Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds a critical appraisal. *J. Food Sci. Technol.* 33: 95-107.

Beers K. W., Nejad, H., Bottje, W. G. (1992). Aflatoxin and glutathione in domestic fowl (*Gallus domesticus*)--I. Glutathione elevation and attenuation by high dietary methionine. *Comp. Biochem. Physiol.* 101: 239.

Bermudez A. J., Ledoux R. D., Rottinghaus E. G., Stogsdill L. P., Bennett A. G. (1997). Effects of feeding *Fusarium fujikuroi* culture material containing known levels of moliniformin in turkey poults. *Avian Pathol.* 26:565-577.

Bezuidenhout S. C., Gelderblom W. C. A., Gorst-Allman C. P., Horak R. M., Marasas W. F. O., Spisteller G., Vlegaar R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium verticillioides*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 743-745.

Bohn J. A., Bemiller J. N. (1995). (1,3) b-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure functional activity relationships carbohydrate polymers. 28:3-14.

Broomhead J. N., Ledoux R. D., Bermudez J. A., Rottinghaus E. G. (2002). Chronic effects of fumonisin B₁ in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. *Poult Sci.* 81: 56-61.

Campbell I. M. (1984). Secondary metabolism and microbial physiology. *Adv. Microbiol. Physiol.* 25:198-201.

Casado M. J., Theumer M., Masih T. D., Chulze S., Rubinstein R. H. (2000). Experimental subchronic mycotoxicoses in mice: individual and combined effects of dietary exposure to fumonisinas and aflatoxin B₁. *Food and Chem. Tox.* 39:579-586.

Castegnaro M., Garren L., Galendo D., Gelderblom W. C. A., Chelule P., Dutton M. F., Wild C. P. (1998). Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *J. Chromat. B.* 720:15-24.

Castegnaro M., Garren L., Gaucher I., Wild C. P. (1996). Development of a new method for the analysis of sphinganine and sphingosine in urine and tissues. *Nat. Toxins.* 4:284-290.

Cavaglieri L., Etcheverry M., Chulze S. (1997). Control biológico sobre *Fusarium verticillioides*. Uso potencial de *Bacillus subtilis*. 2º Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Maracay, 14 – 18 de Julio de 1997. Venezuela. pp122.

Chanda S., Mehendale H. M. (1996). Role of nutrition in the survival after hepatotoxic injury. *Toxicology* 111:163-78.

Charmley L. B., Prelusky D. B. (1994). Decontamination of *Fusarium* mycotoxins. En: *Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxins.* Miller J.D., Trenholm H.L.(eds.). Eagan Press, St. Paul, Minnesota, pp.421-435.

Charmley L. B., Trenholm H. L., Prelusky D. B., Rosenberg A. (1995). Economic losses and decontamination. *Nat. Tox.* 3:199-203.

Chatterjee S., Clarke K. S., Kwiterovich P. O. Jr. (1986). *J. Biol. Chem.* 261:13474- 13479. In Riley, R. T., Wang, E., and Merrill, Jr. A. H. 1994. Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisinas. *Journal of AOAC.*77 (2): 533-540.

Chiacchiera S. M., Magnoli C., Astorga P., Miazzo R., Combina M., Dalcero A., Kikot A., Basaldella E. (2000). Use of synthetic zeolites to adsorb different mycotoxins, prevention of micotoxicosis. *Actualidades de Fisicoquímica orgánica.* 218-236.

Chulze S. N., Ramírez M. L., Farnuchi M. C., Pascale M., Visconti A., March G. (1996). *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stage. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2797-2801.

Colvin B. M., Harrison L. R. (1992). Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathology*, 117: 79-82.

Daniel W. W. (1989). *Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud.* Ed. Limusa, Grupo Noriega Editores. México D.F.

Davidson J. N., Babish J. G., Delaney K. A., Taylor D. R., Phillips T. D. (1987). Hydrated sodium calcium aluminosilicate decreases the bioavailability of aflatoxin in the chicken. *Poult. Sci.* 66(supl. 1): 89.

Doko M. B., Visconti A., Schjoth J. (1995). Incidence and levels of fumonisinas contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agric. Food Chem.* 43:429-434.

Dombrink-Kurtzman M. A., Dvorak J. (1999). Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. *J. Agric. Food Chem.* 47: 622-627.

Dutton M. F., Kinsey A. (1995). Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa. *Mycopathology* 131:31-36.

Dvorska J. E., Surai P. F. (2001). Effect of T2 toxin, Zeolit and mycosorb on antioxidant system of growing quail. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 14:1752-1757.

Dwyer H. R., Kubena L. F., Harvy R. B., Mayura K., Sarr A. B., Buckley S., Bailey R. H., Phillips T. (1997). Effects of inorganic adsorbents and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poult Sci.* 76: 1141-1149.

Espada Y., Ruiz de Gopegui R., Cuadras C., Cabañes F. J. (1994). Fumonisin mycotoxicosis in broilers: weights and serum chemistry modifications. *Avian Dis.* 38: 454-460.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in 1997.

Fernandez V., Simizu K., Barros S. B., Azzalis L. A., Pimentel R., Junqueira V. B., Videla L. A. (1991). Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism: related enzymes' activities, efflux, and turnover. *Endocrinology* 129:85-91.

Galvano F., Pietri A., Bertuzzi T., Bognanno M., Chiess L., De Angelis A., Galvano M. (1997). Activated carbons: in vitro affinity for fumonisin B1 and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J. Food Prot.* 60: 985-991.

Galvano F., Pietri A., Bertuzzi T., Piva A., Cies L., Galvano M. (1998). Activated carbons: in vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J. Food Prot.* 61: 469-475.

Galvano F., Piva A., Ritieni A., Galvano, G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J Food Prot.* 64: 120-131.

García M. R. A. (2002). Evaluación de secuestrantes de micotoxinas para reducir la toxicidad en dietas para pollo de engorda contaminadas con cultivos de *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium tricinatum* productores de ocratoxina y toxina T2. Tesis de Maestría en Ciencias. División de Estudios de Posgrado e Investigación. FMVZ. UNAM.

Gelderblom W. C. A., Kriek N. P. J., Marasas, W. F. O., Thiel P. G. (1991). Toxicity fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis* 12: 1247-1251.

Gelderblom W. C. A., Marasas, W. F. O., Thiel, P., G., Vlegaar, R., Cawood, M. E. (1992). Fumonisins: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathology* 117: 11-16.

Goldin E., Roff C. F., Miller F. P. S., Rodriguez-Lafrasse C., Vanier T. M., Brady O. R., and Pentcher G. P. (1992). Type C Niemann- Pick disease: A murine model of the lysosomal cholesterol lipodosis accumulate sphingosine and sphinganine in liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 1127:303-311.

González A. U., (1995). El maíz y su conservación. Ed. Trillas. México D.F. p.p. 177-278.

González, I. J. F. (1998). Maíz. Agro-Síntesis. Ed. Año Dos Mil. S. A. México, D. F.

Gumprecht L. A., Marcucci A., Weigel R. M. Vesonder R. F., Riley R. T., Showker J: L., Beusley V. R., Hascheck W. M. (1995). Effect of intravenous fumonisin B₁ in rabbits Nephrotoxicity and sphingolipid alterations. *Natural Toxins.* 3: 395-403.

Hannun Y. A., Bell R. M. (1989). Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science.* 243:500-507.

Harvey R. B., Kubena L. F., Phillips T. D. (1993). Evaluation of aluminosilicate compounds to reduce aflatoxin residues on toxicity to poultry and livestock: a review report. *Sci Total Environ.,* 2 : 1453-1457.

Haschek W. M., Kim H. Y., Motelin G. K., Stair E. L., Beasley W. J., Chamberlain W. J., Riley R. T. (1993). Pure fumonisin B₁ as well as fumonisin-contaminated feed, alters swine serum and tissue sphinganine and sphingosine levels, biomarkers of exposure. *Toxicol.* 13:232-236.

Henry M. H., Wyatt R. D., Fletcher O. J. (2000). The toxicity of purified fumonisin B₁ in broiler chicks. *Poultry Sci.* 79: 1378- 1384.

Hissin P.J., Hilf R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathion in tissues. *Analytical Biochemistry* 74: 214-226.

Hussein H. S., Brasel L. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology* 167: 101-134.

Huwig A., Freimund S., Kappeli O., Dutler H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* 122: 179-188.

IARC. International Agency for Research on Cancer. (1993). Some naturally occurring substances: Foods items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins; IARC, Monographs on evaluation od carcinogenic risk to human, Vol. 56. Lyon, France.

Ibrahim I. K., Shareef A. M., Al-Joubory K. M. (2000). Ameliorative effects of sodium bentonite on phagocytosis and Newcastle disease antibody formation in broiler chickens during aflatoxicosis. *Res. Vet. Sci.* 69 :119-122.

IFCC methods for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes. *Clin. Chim acta* 70:F19. 1976.

IFCC methods for the measurement of the aspartate aminotransferase L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase EC 2.6.1.1., 1997. *Clin. Chim. Acta* 80: F21.

Jackson L. S., Bullerman L. B. (1999). Effect of processing on *Fusarium* mycotoxins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 459: 243-261.

Jindal N., Mahipal S. K., Rottinghaus G. E. (1999). Occurrence of fumonisin B₁ in maize and poultry feeds in Haryana, India. *Mycopathology* 148: 37-40.

Joseleau J. P., Lefebvre A., Ruel K. (1999). Les glucides de paroi des levures aliment industrielles.

Kubena L. F., Edrington T. S., Harvey R. B., Buckley S. A., Phillips T. D., Rottinghaus G. E., Casper H. H. (1997). Individual and combined effects of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 76: 1239-1247.

Kubena L. F., Edrington T. S., Kamps-Holtzaple C., Harvey R. B., Elissalde M. H., Rottinghaus G. E. (1995). Effects of feeding fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and aflatoxin singly and in combination to turkey poults. *Poult. Sci.* 74:1295-303.

Kubena L. F., Harvey R. B., Buckley S. A., Bailey R. H., Rottinghaus G. E. (1999). Effects of long-term feeding of diets containing moniliformin, supplied by *Fusarium fujikuroi* culture material, and fumonisin, supplied by *Fusarium moniliforme* culture material, to laying hens. *Poultry Sci.* 78: 1499-1505.

Kubena L. F., Harvey R. B., Phillips T. D., Clement B. A. (1993). Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate on aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 72: 651-657.

Lahnborg G., Hedstrom K. G., Nord C. E. (1982). The effect of glucan a host resistance activator and ampicillin on experimental intrabdominal sepsis. *J. Reticuloendotelial Society* 32:347-353.

Ledoux D. R., Broomhead N. J., Bermudez J. A., Rottinghaus E. G. (2003). Individual and combined effects of the fusarium mycotoxins fumonisin B₁ and moniliformin in broiler chicks. *Avian Dis.* 47:1368-1375.

Ledoux D. R., Brown T. P., Weibking S. T., Rottinghaus G. E. (1992). Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J. Vet. Invest.* 4:330-333.

Ledoux D. R., Rottinghaus G. E., Bermudez A. J., Alonso-Debolt M. (1999). Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poult. Sci.* 78: 204-210.

Li Y. C., Ledoux D. R., Bermudez A. J., Fritsche K. L., Rottinghaus G. E. (1999). Effects of fumonisin B₁ on selected immune responses in broiler chicks. *Poult. Sci.* 78: 1275-1282.

- Lim C. W., Parker H. M., Vesonder R. F., Haschek W. M. (1996). Intravenous fumonisin B₁ induces cell proliferation and apoptosis in the rat. *Nat. Toxins*. 4: 34-41.
- Liu Y. L., Roebuck B. D., Yager J. D., Groopman J. D., Kensler T. W. (1988). Protection by 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (oltipraz) against the hepatotoxicity of aflatoxin B₁ in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 93:442-51.
- López-García R., Park D. L. (1998). Effectiveness of postharvest procedures in management of mycotoxin hazards. En: *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Eds. Sinha K.K., Bhatnagar D. Marcel Dekker, Inc. pp 407-433.
- Machen M. D., Clement B. A., Shepherd E. C., Sarr A. B., Pettit R. E., Phillips T. D. (1988). Sorption of aflatoxins from peanut oil by aluminosilicates. *Toxicologist*., 8:265.
- Magnoli C. (2002). Estudios sobre prevención y control de micotonina en alimentos balanceados para aves. *Tesis Doctoral*, UNR., Río Cuarto, Argentina.
- Manning R.O., and Wyatt D.R. (1990). Effect of cold acclimation on broiler chicks resistance to acute aflatoxicosis. *Poult. Sci*. 69:388-396.
- Marasas W. F. O., Nelson P. E., Toussoun T. A. (1984). Toxigenic *Fusarium* species, Identity and Mycotoxicology. Penn State Univ.Press., University Park. pp 328.
- Marín F. E., del Río G. J. C., Moreno R. C., Hernández R. J. O. (2003). Efecto comparativo de fumonisina y aflatoxina en el pollo de engorda. ANECA, *Memorias convención anual*, Boca del Río, Ver. Méx.
- Masimango N., Remacle J., Ramaut J. (1978). The role of adsorption in the elimination of aflatoxin B₁ from contaminated media. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*. 6: 101-105.
- Masse P. G., Weiser. P. (1994). Effects of dietary proteins and yeast *Saccharomyces cerevisiae* on vitamin B₆ status during growth. *Ann Nutr Metab*. 38(3):123-131.
- Merril A. H. Jr. (1991). Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. *J. Bioenerget Biomembr*. 23, 83-104.
- Merril A. H. Jr., Wang E., Vales T. R., Smith E. R., Schroeder J. J. Menaldino D. S. Alexander C., Crane H. M., Xia J., Liotta D. C., Meredith F. I., Riley R. T. (1996). Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis. *Adv. Exp. Med. Biol*. 392, 297-206.
- Merrill A. H. Jr., Wang E., Gilchrist D. G., Riley R. T. (1993) Fumonisin and other inhibitors of de novo sphingolipid biosynthesis. *Adv.Lipid Res.*,26: 215- 234.
- Mgbodile M. U., Holscher M., Neal R. A. (1975). A possible protective role for reduced glutathione in aflatoxin B₁ toxicity: effect of pretreatment of rats with phenobarbital and 3-methylcholanthrene on aflatoxin toxicity. *Biochem Pharmacol*. 22:1125-32.

Miazzo R., Rosa C. A., De Queiroz Carvalho E. C., Magnoli C., Chiacchiera S. M., Palacio G, Saenz M., Kikot A., Basaldella E, Dalcero A. (2000). Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poult Sci.* 79:1-6.

Mumpton F. A., Fishman P. H. (1997). The application of natural zeolites in animal science and aquaculture. *J. Anim. Sci.* 45:1188-1203.

Murphy M. E., King, J. R. (1990). Diurnal changes in tissue glutathione and pro-teins pools of molting and nonmolting white-crowned sparrows: the influence of photoperiod and feeding schedule. *Physiology Zoological* 63: 1118-1140.

Nahm K. H. (1995). Prevention of aflatoxicosis by addition of antioxidant and hydrated sodium calcium aluminosilicate to diet of young chicks. *Japanese Poult. Sci.* 32: 117-127.

Nelson P.E.(1992) Taxonomy and biology of *F. moliniforme*. *Mycopathology*.117:29-36.

Nelson P. E., Plattner R. D., Shackelford D. D., Desjardins A. E. (1992). Fumisin B₁ production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in section *Liseola* and by some related Species. *App. Environ. Microbiol.* 58 (3):984-989.

Norred W. P., Voss K. A. (1994). Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J Food Prot.*, 57:52-57.

North M. O., Bell D. D. (1993). Manual de producción avícola. Tercera edición. El Manual Moderno,SA de CV. México. D.F.

Oguz H., Kurtoglu V. (2000). Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *Br. Poult. Sci.*, 41 : 512-517.

Oguz H., Kurtoglu V., Coskun B. (2000). Preventive efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb.) exposure. *Res. Vet. Sci.*, 69 : 197-201.

Olsen R. (1995). Mannanligosacáridos: Experience in commercial turkey production Pages 389-392. in *Biotechnology in the Feed Industry*. Lyons and Jacques ed. Nottingham University Press, Loughborough, Leics, UK.

Onifade A. A., Odunsi A., Babatunde, G. M., Muma E. (1999). Comparison of the supplemental effects of *Saccharomyces cerevisiae* and antibiotics in low protein and high fiber diets fed to broiler chickens. *Arch. Tierernahr.* 52(1):29-39.

Oswald I. P., Comera C.(1998). Immunotoxicity of mycotoxins. *Revue. Med. Vet.*, 149: 585-590.

Osweiler G. D. (2000). Mycotoxins contemporary issues of food animal health and productivity. *Vet Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 16:511-530.

- Parlat S. S., Yildiz A. O., Oguz H. (1999). Effect of clinoptilolite on performance of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) during experimental aflatoxicosis. *Br. Poult. Sci.*, 40: 495-500.
- Pelhate J. (1988). Ecology of the microflora of grains and seeds. En: Preservation and storage of grains, seeds and their by-products. Multon J. (ed.). Lavoisier publishing, New York. pp.244-262.
- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.*, 77: 754-766.
- Pérez D. A. (1996). Adición de proteínas de soya al maíz. Centro de Asistencia Técnica, Asoc. Americana de soya. México, D.F.
- Perilla N. S., Diaz G. J. (1998). Incidence and levels of fumonisin contamination in Colombian corn and corn products. *Mycot. Res.* 14: 74-82.
- Peterson G. L. (1997). A simplification of the protein assay method of lowry et al., which is more generally applicable. *Annals of Biochemistry* 58: 743-764.
- Phillips T. D., Kubena L. F., Harvey R. B., Taylor D. R., Heidelbaugh N. D. (1988). Hydrated sodium calcium aluminosilicate: A high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Sci.*, 67: 243-247.
- Phillips T. D., Sarr A. B., Grant P. G. (1995): Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Nat. Toxins.*, 3: 204-213.
- Pimentel D. (1991). World resources and food losses to pests. En: Ecology and management of food industry Pests. Gortham J.R. (ed.). FDA Tech. Bull. 4, Assoc. Off. Anal. Chem. Arlington, VA. pp. 5-11.
- Pittet A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an updated review. *Revue. Med. Vet.* 6: 479-492.
- Piva G., Galvano F., Pietri A., Piva A. (1995). Detoxification methods of aflatoxins: a review. *Nutr. Res.* 5: 689-715.
- Plattner R. D., Weisleder D., Shackelford D. D., Peterson R., Powell R. G. (1992). A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathology* 117: 23-28.
- Postupolski J., Rybinska K., Szczesna M., Karlowski K., Ledzion E. (1999). The review of the European Union documents relating to contamination of aflatoxins in food. *Rocz. Panstw. Zaki-Hig.*, 50: 57-67.
- Prelusky D. B., Rotter B. A., Rotter R.G. (1994). Toxicology of mycotoxins. En *Mycotoxins in grain-compounds other than aflatoxin*. Miller, J. D., Trenholm, H. L. Eds. Eagan Press, St Paul, Minnesota, USA. pp. 359-403.

- Qiu M., Liu Xiumei. (2001). Determination of sphinganine, sphingosine and SA/SO ratio in urine of humans exposed to dietary fumonisin B₁. *F. Add. Cont.* 3:263-269.
- Quezada T., Martínez A., Valdivia A. G. (1995). Cambios biológicos en pollos de engorda producidos por la administración de aflatoxina B₁. Memorias de la Reunión de Avances en Investigaciones Agropecuarias, PICP, 8: 135-140.
- Ramos A. J., Gremmels F., Hernández E. (1996). Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. *J. Food Prot.* 59:631-641.
- Ramos A. J., Hernández E. (1997). Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilication addition to feedstuffs. A review. *Anim. Feed Sci Techno.* 65: 197-206.
- Reyes V., Ruelas M., Udave F. C. G. (1997). Detección de fumonisinas en masa y tortillas que se expenden en la Zona Metropolitana de Guadalajara. Memorias de la XIV Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de Alimentos. Guadalajara Jalisco, México.
- Rheeder J. P., Marasa W. F. O., Thiel P. G., Sydenham E. W., Shephard G. S., Van Schalkwyk D. J. (1992). Fusarium verticillioides and fumonisin in corn in relation to human esophageal cancer in Traskei. *Phytopathology* 82: 353-357.
- Riley R. T., Norred W. P., Bacon C. W. (1993). Fungal toxins in foods recent concerns. *Anu. Rev. Nutr.*, 13: 167-189.
- Riley R. T., Voss K. A., Yoo H. G., Gelderblom W. A. C., Merrill A. H. Jr. (1994). Mechanism of fumonisins toxicity and carcinogenesis. *J. Food Prot.* 57: 638-645.
- Ross P. F., Rice L. G., Plattner R. D., Osweiler G. D., Wilson T. M., Owens D. L., Nelson H. A., Richard J. L. (1992). Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. *Mycopathology* 114:129-135.
- Ross P. F., Nelson P. E., Richard J. L., Osweiler G. D., Rice L. G., Plattner R. D., Wilson T. M. (1990). Production of fumonisins by *F. moniliforme* and *F. proliferatum* isolated associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbil.*, 56 : 3225-3226.
- Rother J., van Echten G., Schwarzmann G., Sandhoff K. (1992). Biosynthesis of sphingolipids dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultures cells. *Biochem. Biophys. Resum. Commun.* 1: 14-20.
- Santin E., Paulillo A. C., Krabbe E. L., Macari M. (1999). Humoral immunity against Newcastle disease virus in broilers fed *S. cerevisiae* cell wall and aflatoxin. *J. Anim. Sci.* 79(1):301-308.
- SAS Institute (1989-1996) SAS/STAT^{MR} User's guide: statistics. 1996 Edition. SAS Institute Inc, Cary, N.C. USA.

Scott P. M. (1997). Multi-year monitoring of Canadian grains and grains-based foods for trichothecenes and zearalenone. *Food Addit. Contam.* 14: 333-339.

Scott P.M. (1998). Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue. Med Vet.*, 149: 543-548.

Scudamore K. A., Hetmanski M. T., Chan H. K., Collins S. (1997). Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Addit. Contam.* 14: 157-173.

Seo J.A., Lee Y.W. (1999). Natural occurrence of the series of fumonisins in moldy corn. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1331-1334.

Shephard G. S., Sydenham E. W., Thiel P. G., Gelderblom, W. A. C. (1990). Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.* 13:2077-2080.

Shephard G. S., Thiel P. G., Stockenstrom T. S., Sydenham E. W. (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Intern.*, 79: 671-687.

Shephard G. S., Thiel P. G., Sydenham E. W., Vleggaar R., Alberts J. F. (1994). Determination of the mycotoxin fumonisin B₁ and identification of its partially hydrolyzed metabolites in the feces of non human primates. *Food. Chem. Toxicol.*

Sies H., Ketterer (eds). (1988). *Glutathione Conjugation: Its Mechanism and Biological Significance.* Academic Press. London.

Sinha K. K.(1998). Detoxification of mycotoxins and food safety. In: *Mycotoxins in agriculture and food safety.* Dinha K.K., Bhatnagar D. Ed. Marcel Dekker, Inc. pp. 381-405.

Smith E. R., Merrill A. H. Jr. (1993). Altering *de novo* sphingolipid biosynthesis affects phospholipid profiles in J774 macrophages. *FASEB J.* 7:A173 (Abstract). En Riley, R. T., Voss, K. A., Soo Yoo. H., Gelderblom, W. C. A., and Merrill, A. 1994b. Mechanism of Fumonisin toxicity and carcinogenesis. *J. Food Prot.* 6:528-535.

Solfrizzo M., Chulze S. N., Mallmann C., Visconti A., De Girolamo A., Rojo F., Torres A. (2004). Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. *Food Addit Contam.* 21:1090-5.

Solfrizzo M., Avantiaggiato G., Visconti A. (1997). Rapid method to determine sphinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. *J. Chromat. B.* 692: 87-93.

Spring P., Wenk C., Dawson K.A., Neman K.E. (2000). The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the cecal of salmonella-challenged broiler chicks. *Poult. Sci.* 79(2):205-211.

Stack M. E., Eppley R. M. 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn products. *J. AOAC Int.*, 75:834-837.

Stanley V. G., Ojo R., Woldesenbet S., Hutchinson D. H., Kubena L. F. (1993). The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* 72: 1867-1872.

Stockenstrom S., Sydenham E.W., Shepard G.S. (1998). Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of commercial unprocessed maize imported into South Africa from Argentina and the USA during 1992. *Food Addit. Contam.* 15: 676-680.

Swamy H. V. L. N., Smith T. K., Karrow A. N., Boermans H. J. (2004). Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with fusarium mycotoxins on growth and immunological parameters of broiler chicks. *Poult. Sci.* 83:533-543.

Swamy H. V. L. N., Smith T. K., MacDonald E. J., Boermans H. J (2003). Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pigs, and efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.* 81:2792-2803.

Sydenham E. W., Thiel P. G., Marasas W. F. O., Shephard G. S., Van Schalkwyk D. J., Koch K. R. (1990). Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1900-1903.

Sydenham E. W., Shephard G. S., Thiel P. G., Marasas W. F. O., Stockenstrom S. (1991). Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 39:2014-2018.

Sydenham E. W., Shephard G. S., Thiel P. G., Marasas W. F. O., Rheeder J. P., Peralta Sanhueza C. E., González H. H., Resnik S. (1993a). Fumonisin in Argentinian field trial corn. *J. Agric. Food Chem.* 41: 891-895.

Task, Force Report. (1989). Micotoxins Economic and Health Risks. Council for Agricultural Science and Technology., Iowa No. 116. 11-69.

Thiel P. G., Marasas W. F. O., Sydenham E. W., Shephard G. S., Gelderbolm W. A. C. (1991a). Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1089-1093.

Tietz, N. W. 1999. Clinical guide to laboratory test, 3rd ed. Saunder Co

Trucksess M. W., Stack M. E., Nesheim S., Albert R., Romer T. (1994) Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 77:1512-1521.

Turner P.C., Nikiema P., Wild C. P. (1999). Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutation Research* 443: 81-93.

Unión Nacional de Avicultores (2003). <http://www.una.com.mx>

Valdivia A. G., Martínez A., Damián F J., Quezada T., Ortiz R., Martínez C., Llamas J., Rodríguez M. L., Yamamoto L., Jaramillo F., Loarca-Piña M. G., Reyes J. L. (2001). Efficacy of N-Acetylcysteine to reduce the effects of aflatoxin B₁ intoxication in broiler chickens. *Poult Sci.*, 80: 727-734.

van Egmond H. P. (1995). Mycotoxins: regulation, quality assurance and reference materials. *Food Addit. Contam.* 12: 321-330.

Voss K. A., Chamberlain W. J., Bacon C. W., Tiley R. T., Norred W. P. (1995). Subchronic toxicity of fumonisin B₁ to male and female rats. *Food Addit and Contam.* 12: 473-478. En Van der Westhuizen L., Brown, N. L., Marasas W. F. O., Swanevelder S and Shephard, G. S. (1999). Sphinganine/Sphingosine ratio in plasma and urine as a possible biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa. *Food and Chem. Toxicol.* 37: 1153-1158.

Wang E., Norred C. W., Bacon R. T., Riley R. T, Merrill A. H. Jr. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated by *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* 266: 14486-14490.

Wang E., Norred C. W., Bacon R. T., Riley R. T, Merrill A. H. Jr. (1992). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated by *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* 266: 14486-14490.

Ware G. M., Umrigar P. P., Carman Jr. A. S., Kuan S. S. (1994). Analytical letters, evaluation of fumoni-test immunoaffinity columns, 27 (4): 693-715.

Weibking T. S., Ledoux D. R., Bermudez A. J., Turk J. R., Rottinghaw G. E. (1993). Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁ on the young broiler chick. *Poultry Sci.* 72: 456-466.

Weibking T. S., Ledoux R. D., Bermudez J. A., Rottinghaus E. G. (1994) Individual and combined effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in the young turkey. *Poult. Sci.* 73:1517-1525.

Weibking T. S., Ledoux D. R., Bermudez T.P., Rottinghaus G.E. (1993). Fumonisin toxicity in turkey poults. *J. Vet. Diag. Invest.* 5: 75 - 83.

Westhuizen L., Brown N., Marasas F., Swanevelder S., Shephard G. (1999). Sphinganine/Sphingosine Ratio in Plasma and Urine as a Possible Biomarker for Fumonisin Exposure in Humans in Rural Areas of Africa. *Food Chem Toxicol.* 37: 1153-1158.

Yoo F. L. (1977). Mechanism of aflatoxin B₁ inhibition of rat hepatic nuclear RNA synthesis. *J Biol Chem.* 252:3245-51.

Yoo H. S., Norred W. P. Wang, E. Merrill A. H, Riley R. T. (1992). Fumonsin inhibition of the novo sphingolipids biosynthesis and citotoxicity and correlated in LLC-PK cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114:9-15.