



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Postgrado

**COMPARACIÓN DE LA EFICACIA “IN VIVO” DE
TRES ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS EN
POLLOS PARRILLEROS CONSUMIENDO
RACIONES NATURALMENTE CONTAMINADAS
CON DISTINTAS COMBINACIONES DE
MICOTOXINAS**

Dra. María Virginia Mosca Sobrero

**TESIS DE MAESTRIA EN NUTRICION DE
RUMIANTES**

**URUGUAY
2010**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Postgrado

**COMPARACIÓN DE LA EFICACIA “IN VIVO” DE
TRES ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS EN
POLLOS PARRILLEROS CONSUMIENDO
RACIONES NATURALMENTE CONTAMINADAS
CON DISTINTAS COMBINACIONES DE
MICOTOXINAS**

Dra. María Virginia Mosca Sobrero

Ing. Agr. MSc. María de Jesús Marichal
Directora de Tesis

2010

INTEGRACION DE TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Cecilia Cajarville DMTV, PhD

Departamento de Nutrición Animal
Instituto de Producción Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Montevideo, Uruguay

Lina Betucci PhD

Sección Micología
Instituto de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República - Montevideo, Uruguay

Cristina Cabrera Ing. Agr., PhD

Departamento de Producción Animal y Pasturas
Facultad de Agronomía
Universidad de la República - Montevideo, Uruguay

2010

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora y amiga Mariquita por todo el apoyo recibido en estos años, por sus consejos y correcciones y por encima de todo por su amistad y energía cuando por momentos sentí que la meta estaba demasiado lejos.

Al querido e inolvidable Dr. Eugenio Perdomo, por su amistad e incondicional ayuda.

Al Dr. Hebert Trenchi, Dra. Lilian Sierra y Dra. Alicia Dib por su invaluable colaboración para sacar sangre y procesar las muestras.

A la Dra. Rosario Aguirre por enseñarme y realizar en conjunto todas las determinaciones serológicas y hematológicas.

Al Dr. Pedro Martino por orientarme con los estudios y determinaciones realizadas.

Al Dr. Andrés Gil por su invaluable colaboración con el modelo y estudio estadístico.

A mis compañeras y amigas del posgrado que me hicieron “revivir” la vida de estudiante compartiendo clases, exámenes y el estar en un aula nuevamente desde “el otro lado”.

A mis amigos de Facultad que almorzamos a diario y que compartieron estos años de esfuerzo.

A todo el personal de Biblioteca principalmente Rosina Vilaró, Ruth Santesteban, Carolina Pintos y Ana Carolina González por su disposición a conseguir todo el material bibliográfico.

A Patricia Pedreira por ayudarme en la compilación y diagramado de la tesis.

Este trabajo fue parcialmente financiado con fondos de la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico.

Dedico este trabajo muy especialmente a mi familia, a mi esposo Mario que siempre me apoyó en este desafío dándome su energía, consejos, amor y paciencia y a mis hijos Cecilia, Felipe y Josefina por acompañarme, alentarme y por el amor que me dan todos los días.

INDICE

<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	3
2.1. Descripción de las micotoxinas y su acción	3
2.1.1. Toxinas del Género <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>	3
2.1.1.1. Aflatoxinas	3
2.1.2. Toxinas del género <i>Fusarium</i>	6
2.1.2.1. Trichotecenos	7
2.1.2.2. Fumonisinias	9
2.1.2.3. Zearalenona	10
2.2. Límites de tolerancia de micotoxinas	11
2.3. Aditivos antimicotoxinas	12
2.4. Dietas naturalmente contaminadas	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	19
3.1 Hipótesis	20
3.2 Objetivo general	20
3.3 Objetivo específico	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1. Ubicación geográfica del estudio	20
4.2. Acondicionamiento del galpón	20
4.3. Animales de experimentación	21
4.4. Preparación de las dietas	21
4.5. Determinaciones de Micotoxinas	22
4.6. AAM evaluados	22
4.7. Tratamientos evaluados	23
4.8. Parámetros evaluados	23
4.9. Análisis estadístico	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSION	27
7. CONCLUSIONES	31
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	32

LISTA DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla I	12
Tabla II	18
Tabla III	22
Tabla IV	26

RESUMEN

En pollos parrilleros (n=160), se evaluó el efecto de incluir aditivos anti-micotoxinas (AMM) en raciones naturalmente contaminadas, sobre parámetros serológicos y hematológicos. Se realizaron dos experimentos; en el experimento 1 se evaluó una ración con 6 ppb de aflatoxina, 4,5 ppm de fumonisina, y en el experimento 2, una ración con 500 ppb de DON, 1,2 ppm de fumonisina y 500 ppb de zearalenona. Cada ración se combinó con aluminosilicato de sodio y calcio hidratado (HSCAS), glucomanos esterificados (EGM) o aditivo multimodular (MM), recibiendo un grupo de aves (en cada experimento) ración sin AAM. A los 21 días se extrajo sangre determinándose Lactato deshidrogenasa (LDH), proteína total, albúmina, ácido úrico, colesterol, hemoglobina y hematocrito. Los experimentos fueron analizados conjuntamente en un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial de tratamientos. Se detectó una interacción ($P < 0.001$) entre la ración y el AAM incluido. En el experimento 1, al incluir AAM resultó en menor ($P < 0.001$) LDH y ácido úrico, y mayor ($P < 0.001$) proteína total, colesterol y hematocrito. La albúmina fue mayor ($P < 0.0001$) con MM y EGM, y menor ($P < 0.02$) con HSCAS. En el experimento 2, al incluir AAM generó menor ($P < 0.001$) LDH, excepto con HSCAS. Con MM se observó mayor ($P < 0.001$) proteína total, albúmina y hematocrito y menor ($P < 0.001$) ácido úrico. Con EGM mayor ($P < 0.001$) colesterol y hematocrito y con HSCAS menor ($P = 0.03$) proteína total y mayor ($P < 0.001$) colesterol. En el experimento 1, los tres AAM evaluados parecerían como promisorios mientras que en el experimento 2, MM aparentó ser el más efectivo.

SUMMARY

In diets naturally contaminated with mycotoxins, effect of inclusion of three anti-mycotoxin additives (AAM) in serological and hematological parameters, was evaluated in growing broiler chickens (n=160). Two trials were conducted. In trial 1, diet contained 6 ppb aflatoxin, 4,5 ppm fumonisin, and in trial 2, diet contained 500ppb DON, 1,2 ppm fumonisin, and 500ppb zearalenone. Each diet was combined with hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS), esterified-glucomannan polymer (EGM) or multi modular additive (MM). In each trial, ration without AAM was provided to a group of broilers. Blood was collected at 21 days to determine lactate dehydrogenase activity (LDH), total protein, albumin, uric acid, cholesterol, haemoglobin and haematocrit. Trials were analyzed together in a completely randomized 2 x 4 factorial design. A diet x AAM interaction was detected ($P < 0.001$). In trial 1, inclusion of AAM resulted in less ($P < 0.001$) LDH and uric acid, and greater ($P < 0.001$) total protein, cholesterol y haematocrit. Albumin was greater ($P < 0.0001$) with MM and EGM, and less ($P < 0.02$) with HSCAS. In trial 2, inclusion of AAM produced less ($P < 0.001$) LDH, except with HSCAS. With MM greater ($P < 0.001$) total protein, albumin y haematocrit, and less ($P < 0.001$) uric acid was observed. With EGM greater ($P < 0.001$) cholesterol y haematocrit was registered, meanwhile less ($P = 0.03$) total protein, and greater ($P < 0.001$) cholesterol was observed with HSCAS. In trial 1, the three AAM seemed to be promissory to counteract the adverse effect produced by the mycotoxins combination evaluated. Meanwhile in trial 2, MM appeared to be the most promissory.

1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos por hongos filamentosos toxicogénicos (Coulombe, 1993; Ballesteros & Ramón, 2000; Chowdhury *et al.*, 2005c). Estas toxinas se forman esporádicamente en condiciones de campo, cuando se produce un estrés para el crecimiento del hongo y durante el almacenamiento cuando se presentan determinadas condiciones ambientales (Humphreys, 1990; Osweiler, 1996; Santin, 2005). Se liberan al medio con la finalidad de inhibir la multiplicación de otros organismos (Santin, 2003; Morante, 2006; Mallmann *et al.*, 2008). Sin embargo, la sola presencia del hongo en el alimento, no indica necesariamente que existan toxinas (Meireles & Riet, 1991; Devewogda & Murthy, 2005; Santin, *et al.*, 2003a).

La contaminación de los alimentos por hongos y micotoxinas ocurre en el mundo entero, así por ejemplo la, Food and Agriculture Organization (FAO) estimó que el 25% de las reservas anuales de granos del mundo estaban contaminadas con micotoxinas (Bhat & Vasanthi, 1999). Estas toxinas causan enormes pérdidas de orden económico, sanitario y comercial aunque el mayor problema se atribuye a los daños que ocasionan en la salud humana y animal, afectando diversos órganos y sistemas (Diekman *et al.*, 1992; Osweiller, 2000; Watts *et al.*, 2003; Wyatt, 2005; Mallman *et al.*, 2008).

Si bien se conocen cerca de 300 micotoxinas, no todas tienen la misma importancia por la frecuencia y las lesiones que producen (Osweiller, 2000; Watts *et al.*, 2003). La tolerancia de los animales a las micotoxinas, varía con la especie, el sexo, la edad, el estado fisiológico y sanitario y las condiciones ambientales de estrés, variando los cuadros tóxicos según los órganos y sistemas involucrados, como también con los tipos, dosis, tiempo de consumo y combinación de toxinas presentes (Chowdhury *et al.*, 2005c; Devewogda & Murthy, 2005; Wyatt, 2005). Esos cuadros se pueden asociar a síntomas de hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, déficit inmunitario o alteraciones reproductivas (Santin, 2005; Riley & Pestka, 2005). Adicionalmente a los efectos directos de las micotoxinas, la metabolización de las mismas puede generar compuestos tóxicos secundarios capaces de pasar a la carne, al hígado, los huevos o la leche, lo que representa un importante riesgo para la salud pública (Jacobson *et al.*, 1974, Midio & Martins, 2000; Mabbett, 2004; Tedesco *et al.*, 2004; Zaghini *et al.*, 2005; Denli *et al.*, 2009).

Un aspecto particular de la mayoría de las micotoxicosis, es la aparición de efectos tóxicos combinados al interactuar varias micotoxinas. Lo más frecuente es que los alimentos sean invadidos por varias especies de hongos y que una especie de hongo produzca más de una micotoxina (Meireles & Riet, 1991; Santin, 2003a; Devewogda & Murthy, 2005; Kumar & Balachandran, 2009). Esta combinación de toxinas a diferentes concentraciones provoca cuadros clínicos confusos (Caemán & Repetto, 1995; Mabbett, 2004; Chowdhury *et al.*, 2005c; Wyatt, 2005). La ingestión continua de alimentos contaminados con bajas dosis de micotoxinas, puede

pasar desapercibida por la ausencia de signos o lesiones evidentes en los animales, pero puede producir severas pérdidas económicas (Osweiller, 2000; Mabbett, 2004; Devegowda & Murthy, 2005; Diaz, 2007).

El empleo de raciones contaminadas por micotoxinas representa una importante limitante en la industria avícola ya que las nuevas líneas comerciales de aves a pesar de tener un potencial genético para performance y conversión alimenticia son muy exigentes en cuanto a la calidad de la dieta y muy sensibles a la presencia de micotoxinas (Mabbett, 2004; Díaz, 2007) lo cual deprime rápidamente el crecimiento y conversión. El amplio espectro de efectos biológicos que producen en las aves, así como su gran resistencia de la mayoría de las micotoxinas a las altas temperaturas, y que no generan inmunidad provoca que su presencia en los alimentos sea un serio problema para la producción avícola (Perusia & Rodríguez, 1997; Devegowda & Murthy, 2005; Díaz, 2007; Janaczyk *et al.*, 2006).

Los efectos tóxicos de las micotoxinas han sido estudiados en su gran mayoría usando alimentos artificialmente contaminados con micotoxinas puras. Esto aportó una valiosa información sobre el modo de acción y el impacto que causan en forma individual. (Kubena *et al.*, 1985; 1990a; 1990b; 1995, Espada *et al.*, 1994, Fernández *et al.*, 1994, 1995) Actualmente existe la tendencia de evaluar los efectos resultantes de la ingestión de raciones naturalmente contaminadas por varias toxinas ya que esto refleja la realidad (Santin, 2003a; Chowdhury, 2004). Se ha comprobado que las micotoxinas presentes en granos naturalmente contaminados, son más tóxicas que las dosis equivalentes de toxina purificada. Esto posiblemente se deba a la presencia de otras micotoxinas no identificadas y de precursores de las mismas que actúan sinérgicamente entre sí (Chowdhury *et al.*, 2005c; Devegowda & Murthy, 2005; Kahn, 2007).

Una alternativa posible para la detoxificación de micotoxinas son los aditivos anti-micotoxinas (AAM) con diferentes mecanismos de acción. Estos productos también se conocen como secuestrantes o adsorbentes de micotoxinas. Son polímeros orgánicos o inorgánicos de gran peso molecular que al añadirse a la ración serían capaces de formar complejos irreversibles con moléculas de micotoxinas en la luz intestinal. Los complejos formados serían indigestibles, obteniéndose así una reducción de la dosis de micotoxinas absorbidas (Campos & Malaquido, 2003; Díaz & Smith, 2005). Actualmente se admite que todas las dietas para aves en la fase pre inicial deberían incluir en su formulación AAM y en el resto de las fases debería tenerse en cuenta el riesgo de su presencia para incluirlas (Mallman, 2008).

En Uruguay se dispone de distintos tipos de AAM entre los que se encuentran los aluminio silicatos hidratados de calcio y sodio (HSCAS), los glucomanos esterificados (EGM) y un tercer aditivo multi modular (MM) formado por cinco fracciones minerales, enzimas, microorganismos, sustancias fitogénicas y constituyentes ficolíticos

El objetivo de este trabajo, fue evaluar la actividad detoxificadora de estos AAM en raciones naturalmente contaminadas con aflatoxinas, fumonisina, DON y/o zearalenona en los valores séricos (LDH, proteínas totales, albúmina, ácido úrico y colesterol) y hematológicos (Hb, Hto y MCHC) mediante una prueba “*in vivo*” realizada en pollos parrilleros en iniciación.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. Descripción de las micotoxinas y su acción.

2.1.1. Toxinas del Género *Aspergillus* y *Penicillium*

2.1.1.1. Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AF) son metabolitos tóxicos producidos por hongos del género *Aspergillus* principalmente *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* y cepas de *Penicillium*, son las más distribuidas a nivel mundial (Blood & Radostitis, 1992; Smith 1997; Devegowda *et al.*, 1998; Miazzo *et al.*, 2000; Castiglioni *et al.*, 2006). Fueron las primeras en ser caracterizadas al inicio de la década del 60 y las más estudiadas hasta el momento en términos de su naturaleza química, mecanismo de acción, toxicocinética y efectos producidos (Price *et al.*, 1993; Midio & Martins, 2000; Devegowda & Murthy, 2005).

Químicamente son furocumarinas, presentando un núcleo central cumarínico unido a una estructura bifuránica por lo que se clasifican como compuestos furánicos policíclicos (Osweiller, 1996; Midio & Martins, 2000). Son fluorescentes lo que es importante para su detección (Osweiller, 1996; González & Heus, 2000; Midio & Martins, 2000; Roder, 2002). Se forman naturalmente en las conidias como productos metabólicos de los hongos, excretándose en un 90% (Jurado Couto, 1989). Estas micotoxinas son hepatotóxicas, carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas, e inmunosupresoras (Roder, 2002; Pimpukdee *et al.*, 2004; Devegowda & Murthy, 2005; Arrieta *et al.*, 2006a). Se producen en sustratos muy variados, principalmente los granos de maíz, centeno, sorgo, cebada, trigo, y arroz y las semillas de algodón y maní (Osweiller, 1996; Perusia & Rodríguez, 1997; Klaasen & Watkins, 2000).

Se conocen en la actualidad por lo menos 18 aflatoxinas (Tejada *et al.*, 2008) siendo los principales tipos de interés B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂. De estas la AFB₁ es la más tóxica y la más estudiada (Jurado Couto, 1989; Coulombe, 1993; Hollinger, 1999; Castiglioni *et al.*, 2006). Las 4 primeras las producen los hongos en forma natural y se encuentran en el alimento, el resto son productos metabólicos de éstas, formándose en el animal por microorganismos presentes en su tubo gastrointestinal, o son producidas espontáneamente en respuesta a productos químicos del medio ambiente. (Rivero *et al.*, 1991; Osweiller, 1996; Mc Kenzie *et al.*, 1998, Tejada *et al.*, 2008). Las letras B y G se deben al color fluorescente que adoptan en la cromatografía en capa fina al irradiarlas con luz ultravioleta azul (B: blue) o verde (G: green) (González & Heuhs, 2000). La letra M indica leche (Milk)

refiriéndose a la vía de eliminación más importante de dicha toxina (Osweiler, 1996; Midio & Martins, 2000).

La principal vía de ingreso de estas micotoxinas al animal es la oral, aunque pueden ingresar por inhalación de, esporas o fragmentos de micelios. En general, las aves son las especies más susceptibles a las aflatoxinas, siendo mayor su acción en la fase inicial de crecimiento, o sea, durante los primeros 21 días de vida (Perusia & Rodríguez, 1997; Santurio, 2000). Esta alta toxicidad en las aves se debe a su rápida absorción desde el tracto gastrointestinal por ser liposolubles, absorbiéndose por difusión pasiva (Midio & Martins, 2000). Luego de absorbidas se ligan rápidamente en forma reversible a la albúmina y a otras proteínas, para ser transportadas al hígado, donde por su liposolubilidad entran rápidamente al hepatocito (Santurio, 2000; Midio & Martins, 2000; Riley & Pestka, 2005). En el hígado, órgano blanco de las aflatoxicosis, estas toxinas son biotransformadas por enzimas microsomales del sistema de oxidasas mixtas en varios productos metabólicos (Osweiler, 1996; Riley & Pestka, 2005). Estos metabolitos pueden ser detoxificados por conjugación con aminoácidos, ácido glucurónico o sales biliares y ser eliminados por orina y heces. La manifestación de la toxicidad de las aflatoxinas dependerá del balance entre la generación de metabolitos tóxicos y su metabolización a productos no tóxicos. Las vías metabólicas relacionadas a estos procesos de detoxificación presentan diferencias entre las especies animales, lo cual define la susceptibilidad de las mismas a las aflatoxicosis (Hollinger & Ekperigin, 1999; Tedesco *et al.*, 2004; Riley & Pestka, 2005).

Entre los productos metabólicos que se forman se incluye: aflatoxicol, aflatoxina Q₁, aflatoxina P₁, aflatoxina M₁ y aflatoxina 8,9 epóxido, siendo este último particularmente tóxico (Tung *et al.*, 1972; Coulombe, 1993; Osweiler, 1996; Midio & Martins, 2000). Su toxicidad se debe a que es altamente reactivo por ser inestable, por este motivo busca estabilidad química interactuando con compuestos endógenos (ADN, ARN y proteínas) produciendo aductos (Klaassenn & Watkins, 2000; Roder, 2002; Riley & Pestka, 2005). Su acción produce severas lesiones principalmente en hígado, alterando el metabolismo hepático de proteínas lípidos y glúcidos, que se manifiestan en los parámetros séricos (disminución de proteínas totales, albúmina, triglicéridos, colesterol, glucosa.) y hematológicos (disminución del: recuento de eritrocitos, hematócrito, concentración de hemoglobina, trombocitos y linfocitos) (Fernández *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 1995; Basmacioglu *et al.*, 2005; Wyatt, 2005).

Las aflatoxinas pueden alterar el metabolismo proteico hepático al unirse al ADN inhibiendo la ARN polimerasa e interfiriendo con la transcripción, ya que hay reducción en la síntesis de ARN mensajero (Riley & Pestka, 2005). Las modificaciones en el ADN se producen por dos mecanismos: al intercalarse en el ADN formando un aducto covalente con la guanina, y por la alquilación del ADN con la toxina, resultando en la pérdida de una base del ADN (Coulombe, 1993; Hollinger & Ekperigin, 1999). Como resultado, se producen mutaciones que se pueden reparar espontáneamente o enzimáticamente y los aductos removidos se excretan con la orina. Otras

veces se afecta la actividad de biotransformación y reparación del ADN con riesgos carcinogénicos y mutagénicos (Coulombe, 1993; Hollinger & Ekperigin, 1999; Riley & Pestka, 2005) produciendo mutaciones que son heredables a la siguiente generación de células hepáticas, lo que puede producir carcinoma hepático (Coulombe, 1993). Por esta razón, la International Agency for Research of Cancer (IARC) en 1991 confirmó la inclusión de las aflatoxinas dentro del grupo 1 que comprende los agentes carcinógenos comprobados en humanos (Repetto 1995; Castenaro *et al.*, 1998; Hollinger & Ekperigin, 1999; Midio & Martins, 2000).

La disminución marcada en la síntesis proteica hepática se manifiesta por una disminución de proteínas totales en suero. Este efecto se debe principalmente a la disminución de albúmina, que se sintetiza exclusivamente en el hígado. Las proteínas totales y la albúmina en suero, son los indicadores más sensibles de aflatoxicosis. (Huff *et al.*, 1986; Fernández *et al.*, 1995; Osweiller, 1996; Kaneko, 1997; Mc Kenzie *et al.*, 1998).

Otra manifestación de la disminución de la síntesis proteica, es que se produce una disminución en la síntesis de enzimas involucradas en el metabolismo hepático que actúan sobre proteínas, lípidos, y carbohidratos alterando su funcionalidad (Osborne & Hamilton, 1981; Devegowda & Murthy, 2005; Wyatt, 2005). La disminución de la síntesis de enzimas involucradas en el catabolismo de los aminoácidos, resulta en una menor formación de productos de ese catabolismo (ácido úrico, urea) y por lo tanto de su presencia en suero (Huff *et al.*, 1986; Lumeij, 1997; Devegowda & Murthy, 2005).

Las modificaciones en el metabolismo proteico hepático, también se asocian a una disminución de la fracción proteica de las lipoproteínas (lo que disminuye el transporte y excreción de los ácidos grasos metabolizados en el hígado), y de enzimas vinculadas al metabolismo de lípidos. Por estos motivos la presencia de aflatoxinas se asocia a menores niveles de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos en plasma (Mc Kenzie *et al.*, 1998; Raju & Davegowda, 2000; Aravind *et al.*, 2003; Wyatt, 2005). La disminución de la colesterolemia sería resultado, no solamente de una síntesis limitada de la fracción proteica de las lipoproteínas de baja densidad (VLDL) sino también la disminución de la síntesis y actividad de una o más enzimas, que participan en el proceso (Kubena *et al.*, 1995; Mc Kenzie *et al.*, 1998; Anyanwu *et al.*, 2007). La principal enzima afectada es la hidroximetilglutaril CoA-reductasa (HMG-CoA-reductasa) que interviene en la activación del acetato, lo cual es el primer paso en la biosíntesis del colesterol hepático (Hussein & Brasel, 2001; Sandoval *et al.*, 2004).

También se ha observado disminución en la síntesis de enzimas relacionadas al metabolismo de la glucosa, tales como glucosa-6-fosfatasa y succinato deshidrogenasa (Devegowda & Murty, 2005).

El efecto de las aflatoxinas en la síntesis proteica del hígado, se puede asociar también a los valores hematológicos de animales consumiendo

dietas contaminadas, ya que existen reportes de disminución de transferrina y otras proteínas asociadas a la síntesis de hemoglobina (Tung *et al.*, 1975 a; Maurice *et al.*, 1983; Huff *et al.*, 1986). La disminución de la síntesis de transferrina, proteína transportadora de hierro, compromete la absorción de hierro en el intestino y su transporte. Como resultado, puede producirse anemia al verse disminuida la hematopoyesis (Tung *et al.*, 1972; Huff *et al.*, 1986).

Estas alteraciones en la síntesis de hemoglobina, potencian la anemia hemolítica, característica de las aflatoxicosis, que es consecuencia de que la médula ósea es incapaz de compensar la destrucción prematura de los glóbulos rojos maduros por medio del aumento en su producción. Esta anemia hemolítica se caracteriza por disminución del hematocrito (volumen celular total y recuento de eritrocitos) y del nivel de hemoglobina acompañado de hiperplasia de la médula ósea (Tung *et al.*, 1975^a; Huff *et al.*, 1986; Mc Kenzie *et al.*, 1998). Nuevas investigaciones argumentan que la anemia hemolítica podría estar relacionada a la disminución de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FD) en los glóbulos rojos, lo que podría llevar a una disminución de la potencia antioxidante intracelular, produciendo una oxidación de la hemoglobina que la desnaturaliza y disminuye la vida media del glóbulo rojo (Surai & Dvorska, 2005).

Actualmente se considera que los cambios más importantes que produce la aflatoxina son debidos a la formación de lípido peroxidasas que son tóxicas para los sistemas antioxidantes, provocando una disminución de los mismos. Como resultado, se produce daño oxidativo y aumento de especies activas de oxígeno, que pueden oxidar las moléculas biológicas dañando las membranas celulares y de los organelos lo que puede producir necrosis (Osweiller, 1996; Repetto 1998; Midio & Martins, 2000; Surai & Dvorska, 2005; Guaiame, 2005).

La detección de anemia hemolítica en animales consumiendo dietas contaminadas con aflatoxinas, así como alteraciones de la integridad celular en órganos y tejidos, ha sido asociada a los niveles séricos de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Mc Kenzie *et al.*, 1998; Devegowda & Murthy, 2005). La LDH comprende un grupo de enzimas que participan en la inter conversión de piruvato y lactato y se encuentran en la sangre y otros tejidos del cuerpo, participando en el metabolismo energético de las células y aparecen aumentadas en sangre cuando se altera la integridad celular.

2.1.2. Toxinas del género *Fusarium*

Las micotoxinas producidas por *Fusarium* causan importantísimas pérdidas en la industria avícola (Awad *et al.*, 2006; Devegowda & Murthy, 2005; Girish *et al.*, 2008b). Estas toxinas son numerosas, diversas en la estructura química y en las alteraciones metabólicas que producen en los animales (Smith *et al.*, 2001; Devegowda & Murthy, 2005). En Uruguay al igual que en sur de Brasil, los hongos del género *Fusarium* se destacan como los más importantes en términos de pérdidas globales debido a que

producen muchas micotoxinas y que las condiciones climáticas son más propicias para su producción (Santin *et al.*, 2000 y 2005). Por su ocurrencia en los alimentos, se considera que las toxinas más importantes producidas por este género, son los trichotecenos, las fumonisinas y la zearalenona (Santin *et al.*, 2000; Devegowda & Murthy, 2005; Faixová *et al.*, 2007a; Girish *et al.*, 2008c).

2.1.2.1. Trichotecenos

Los trichotecenos son un grupo de más de 180 micotoxinas con la misma estructura básica (sesquiterpenoide con un núcleo tricotecano), catalogándose como lactosas sesquiterpenas (Roder 2002; Swamy *et al.*, 2002a; Riley & Petska, 2005; Girish *et al.*, 2008a). Poseen el esqueleto de los sesquiterpenoides 12-13 epoxy trichoteceno tetracíclico, siendo este núcleo epóxido, el responsable del efecto tóxico del trichotecenos; observándose frecuentemente efectos aditivos al estar presentes varias toxinas del grupo (Osweiler, 1996; Raju & Devagowda, 2000; Chowdhury *et al.*, 2005b). Los trichotecenos se clasifican en 4 grupos: A, B, C y D, siendo el grupo B el que comprende las toxinas más importantes por su ocurrencia y toxicidad. Una de ellas la 4 deoxynivalenol (DON) también denominada vomitoxina, es la más prevalente de los trichotecenos en los granos que se usan para alimentación animal (Osweiler, 1996; Osweiler *et al.*, 2000; Midio & Martins, 2000; Faixová *et al.*, 2007b). El DON es producido principalmente por el *Fusarium graminearum*, (Teleomorfo *Gibberella zeae*) *F. culmorum* y *F. sporotrichioides* aunque también otros géneros de hongos como *Trichothecium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*; *Cylindrocarpon* (Midio & Martins 2000; Klaassenn C. & Watkins 2000; Ballesteros & Ramón, 2000; Kahn, 2007) producen trichotecenos. Los sustratos que se asocian más frecuentemente a estos trichotecenos, son granos de trigo, maíz y cebada (Osweiler, 2000; Mabbett, 2004).

Estas micotoxinas son rápidamente absorbidas en las partes superiores del intestino delgado y se distribuyen uniformemente por el organismo, no depositándose en órganos o tejidos específicos (Midio & Martins, 2000; Riley & Pestka, 2005; Awad *et al.*, 2007). En el hígado se biotransforman en compuestos menos tóxicos, produciéndose una desepoxidación y posterior conjugación con ácido glucrónico eliminándose principalmente en la orina (Osweiler, 1996; Midio & Martins, 2000; Awad *et al.*, 2007). Así como sucede en las aflatoxinas, el efecto negativo de las trichotecenos, es función del balance entre la generación de metabolitos tóxicos y su metabolización a productos no tóxicos (Riley & Pestka, 2005).

En general, las aves son menos sensibles al DON que otras especies. (Hulan *et al.*, 1982; Moran *et al.*, 1983; Kubena *et al.*, 1985; Swamy *et al.*, 2004a; Murthy & Devegowda, 2005; Awad *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios experimentales (Danicke *et al.*, 2002) sugieren que en pollos, el DON produciría un efecto muy variable, ya que su presencia indica que se habrían dado las condicionantes para que estén presentes otras micotoxinas de *Fusarium* que actuarían con efecto sinérgico.

Los trichotecenos pueden inhibir la iniciación de la síntesis proteica en los ribosomas de las células eucariotas, ya que tienen afinidad por la subunidad ribosomal 60s. También se unen con la enzima peptidil transferasa ribosomal, la que interviene en los pasos de elongación y terminación (Osweiller, 1996; Roder, 2002; Riley & Pestka, 2005). Como consecuencia, de esta inhibición de la síntesis proteica se puede inducir una rápida apoptosis (Mikami et al., 2004). Los tejidos más susceptibles son los que tienen altas tasas de regeneración tales como el hígado (Coulombe, 1993; Santin *et al.*, 2000; Dänicke *et al.*, 2003; Girish *et al.*, 2008a). Por este motivo se detecta disminución de las proteínas plasmáticas y de los niveles de albúmina en aves: pollos parrilleros (Swamy *et al.*, 2002a; Faixova *et al.*, 2007a), gallinas ponedoras (Chowdhury & Smith, 2005b), pavos (Girish *et al.*, 2008a) y patos (Chowdhury *et al.*, 2005a) consumiendo raciones naturalmente contaminadas con DON, y un aumento del ácido úrico en plasma (Swamy *et al.*, 2002a; Chowdhury & Smith 2004 y 2005; Girish *et al.*, 2008a). El aumento del ácido úrico plasmático en aves se explicaría porque los aminoácidos no empleados para la síntesis proteica podrían ser usados como fuente de energía.

La hipoproteïnemia puede agravarse por el rechazo a alimentarse (Girish *et al.*, 2008c), por la disminución de la absorción de nutrientes provocada por la alteración del tránsito de los mismos a través de la membrana del intestino (Coulombe, 1993; Roder, 2002; Osweiller, 2000; Chowdhury *et al.*, 2004; Awad *et al.*, 2004, 2005a y 2007; Girish *et al.*, 2008 b), y por las alteraciones de las vellosidades intestinales y la gastroenteritis que provocan estas toxinas al entrar en contacto directo con las mucosas digestivas (Coulombe 1993; Swamy *et al.*, 2002b; Devegowda & Murthy, 2005; Zaviezo & Contreras, 2007).

Faixová *et al.*, (2007b) demostraron que pollos consumiendo raciones con DON, tuvieron una disminución de los triglicéridos del plasma, posiblemente por una acción similar a la de las aflatoxinas (Kubena *et al.*, 1985; Huff *et al.*, 1986).

Debido a su carácter anfipático, los trichotecenos pueden incorporarse en los compuestos lipídicos de las membranas celulares de los hepatocitos y estimular la peroxidación de las membranas lipídicas. Esto produce una disminución de la glutatión peroxidasa (GSH) y los radicales libres pueden sobrepasar los mecanismos de defensa celulares, causando excesivo estrés oxidativo, con el consiguiente daño celular (Mezes *et al.*, 1999; Roder 2002; Surai & Dvorska, 2005; Faixová *et al.*, 2007a). Estas alteraciones histopatológicas pueden llegar a ser muy graves, produciendo necrosis (Swamy *et al.*, 2002b).

Estas toxinas también poseen acción citotóxica directa sobre la médula ósea, pudiendo producir anemia hemolítica e hipocrómica y leucopenia. Coulombe (1993), Kubena *et al.* (1985), y Harvey *et al.* (1991), reportaron un descenso en el Hematocrito (Hto) y en la concentración de Hemoglobina (Hb) por acción de los trichotecenos en aves. Las células progenitoras hematopoyéticas son susceptibles también a la toxicidad de los

trichotecenos y producen disminución y disfunciones en las mismas (Wyatt 2005; Girish *et al.*, 2008c). La disminución de las células de la sangre parece deberse a fallas en la médula ósea por la mielotoxicidad de estas toxinas, ya que se comprobó que las células circulantes son menos sensibles a su acción (Chowdhury *et al.*, 2005 c; Girish *et al.*, 2008c).

2.1.2.2. Fumonisinias

Las fumonisinias (FB) son un grupo de micotoxinas producidas principalmente por *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*), *F. nygamai*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum* y por hongos del género *Alternaria* (Midio & Martins, 2000; Santin *et al.*, 2000; Bianchi *et al.*, 2005), pudiéndose encontrar presente con otras micotoxinas tales como aflatoxina, DON y Zearalenona (Devegowda & Murthy, 2005).

Químicamente, son hidrocarburos alifáticos con un grupo amino terminal y dos cadenas de ácidos tricarbóxicos. Estas toxinas casi exclusivamente, se asocian al maíz, aunque pueden contaminar otros granos como sorgo y avena (Roder, 2002). Su efecto tóxico puede ser atribuido a la alteración del metabolismo de los esfingolípidos, lo que altera la regulación celular (Osweiler, 1996; Roder, 2002; Devegowda & Murthy, 2005).

Hasta el momento hay 28 tipos de fumonisinias aisladas y caracterizadas destacándose por su frecuencia de aparición, la fumonisina B₁ (FB₁), fumonisina B₂ (FB₂) y fumonisina B₃ (FB₃) (Fernandes *et al.*, 2007). La FB₁ es la más tóxica y abundante, representa el 70% de la detectada en alimentos naturalmente contaminados por fumonisina (Midio & Martins, 2000; Roder, 2002; Devegowda & Murthy, 2005; Castiglioni *et al.*, 2006). Se cataloga como carcinogénica, incluyéndose dentro de la categoría 2B de la IARC (Midio & Martins, 2000) y también como hepatotóxica y nefrotóxica (Kubena *et al.*, 1997; Midio & Martins, 2000; Roder, 2002).

Por su estructura química, presentan baja liposolubilidad, lo que produce baja velocidad de absorción gastrointestinal, y al ser hidrosolubles son predominantemente eliminados con la orina (Midio & Martins, 2000; Riley & Pestka, 2005).

Las fumonisinias producen directa o indirectamente, un espectro amplio de cambios en el metabolismo lipídico y en las vías bioquímicas de las células. Hay inhibición de la enzima N acetyl transferasa, y como consecuencia de esta, se produciría acumulación de bases esfingoides libres (esfinganina), que aumentarían en los tejidos, sangre y orina (Bromead *et al.*, 2002; Tardieu *et al.*, 2007). La esfinganina disminuye la producción de esfingolípidos de membrana celular, que son imprescindibles para la unión con proteínas extracelulares, la comunicación entre células y la estructura de membranas (Henry *et al.*, 2001; Roder, 2002). Como consecuencia, se alteran todas las funciones celulares, pudiendo producirse muerte celular simultánea (apoptosis) y efectos carcinogénicos. Como indicador de pérdida de la integridad celular (Edrington *et al.*, 1997; Osweiler, 1996; Bromead *et*

al., 2002 y Tardieu *et al.*, 2004) describieron aumento de LDH en pollos alimentados con raciones que contenían fumonisina, lo que indicaría lisis celulares que podrían deberse a la peroxidación y pérdida de integridad de las membranas.

La disrupción del metabolismo de esfingolípidos, puede producir incrementos de fosfoglicerolípidos, ácidos grasos y colesterol en plasma (Ledoux *et al.*, 1992; Espada *et al.*, 1994; Osweiler, 1996; Kubena *et al.*, 1997). Estos incrementos se han reportado en aves consumiendo dietas contaminadas con fumonisina con niveles de exposición superiores (> 32 ppm) a los que afectan la performance de las aves. (Tardieu *et al.*, 2007).

En relación a la acción de las fumonisinas sobre el hemograma, hay discrepancias entre las diferentes investigaciones. En pollos, Weibking *et al.*, (1993) y Del Bianchi *et al.*, (2005), no observaron alteraciones ni en el hematocrito ni en la hemoglobina con dosis de hasta 500 ppm de FB₁. En contraposición, Kubena *et al.*, (1997), detectaron que al administrar 300 ppm de FB₁ se produjo un aumento del hematocrito, mientras que Javed *et al.*, (1995), reportaron una disminución del hematocrito y de la hemoglobina con niveles entre 125 y 270 ppm en una ración en pollos de 14 días. El mecanismo de toxicidad específico por el cual se afectan los parámetros hematológicos no está completamente aclarado, relacionándose estas alteraciones a la presencia de otras micotoxinas de *Fusarium* en la ración (Castiglioni *et al.*, 2006). También se ha comprobado una acción sinérgica entre AFB₁ y FB₁ en pollos parrilleros, siendo los efectos tóxicos hematológicos más intensos al estar las dos presentes (Castiglioni *et al.*, 2006).

Las aves son más resistentes que los mamíferos a la acción de esta micotoxinas, siendo los parrilleros relativamente resistentes al cuadro agudo, que solo se alcanzaría con altos niveles de FB₁ (150ppm) produciendo menor crecimiento, y necrosis hepática multifocal (Weibking *et al.*, 1994; Bromead *et al.*, 2002; Devegowda & Murthy, 2005).

2.1.2.3. Zearalenona

La zearalenona (F-2) es producida principalmente por *Fusarium graminearum* y *F. roseum*, aunque también la producen otras especies tales como *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. roseum*, *F. equiseti*, y *F. nivale*. Estas micotoxinas son lactonas del ácido fenólico resorcílico, no son compuestos esteroides pero tienen estructura similar al agente estrogénico zearalenol, por lo que producen respuestas estrogénicas en animales susceptibles (Chi *et al.*, 1980; Diekman *et al.*, 1992; Coulombe, 1993; Osweiler, 1996; Kahn, 2007).

Esta toxina es un fitoestrógeno que puede producir desórdenes reproductivos, asociándose a un síndrome de hiperestrogenismo que varía según la especie, sexo, edad y estadio de madurez reproductiva (Hollinger 1996; Riley & Pestka, 2005).

Frecuentemente se encuentra en forma conjunta con DON, contaminando granos de maíz, trigo, cebada, avena, sorgo, arroz, soja y centeno (Midio & Martins, 2000; Roder, 2002; Riley & Pestka, 2005; Chowdhury *et al.*, 2004; Kahn, 2007). Su propiedad fluorescente puede ser usada como una ventaja analítica al ser irradiada con luz ultravioleta (Midio & Martins, 2000).

Se absorbe en el tracto gastrointestinal y es metabolizada en el hígado por reducción enzimática, convirtiéndose en alfa y beta zearalenol. Estos compuestos son más activos estrogénicamente que el precursor y más polares lo que facilita su posterior eliminación (Osweiler, 1996; Midio & Martins, 2000) por bilis a las heces y en la orina (Osweiler, 1996; Midio & Martins, 2000; Riley & Pestka, 2005).

Se une a los receptores estrogénicos citoplasmáticos 17β estradiol del útero, glándula mamaria, hipotálamo y pituitaria formando un complejo receptor-zearalenona. Este complejo posteriormente migra al núcleo, para unirse a los sitios del ADN para el estradiol iniciando la transcripción selectiva del ARN, incrementando así la síntesis proteica en el aparato reproductor (Hollinger & Ekperigin, 1999; Riley & Pestka, 2005). Como consecuencia, aumenta la secreción de las células endometriales, la síntesis de las proteínas uterinas y el peso del tracto reproductivo (Coulombe, 1993; Riley & Pestka, 2005).

Las aves son relativamente resistentes a la acción de la Zearalenona con una mayor susceptibilidad en los animales jóvenes (Hollinger & Ekperigin, 1999; Dänicke *et al.*, 2002). Esta variación de la susceptibilidad en las diferentes especies, parece explicarse por la afinidad diferencial de la zearalenona con los receptores estrogénicos (Coulombe, 1993).

2.2. Límites de tolerancia de micotoxinas

Para intentar reducir el impacto toxicológico y económico de las micotoxinas, muchos países han intentado regular los niveles de las mismas en alimentos. Estas legislaciones intentan salvaguardar la salud de los consumidores cuidando el interés económico de la producción.

La FAO (2003), presenta los resultados de una encuesta mundial (tabla I) sobre la situación reglamentaria de los valores de tolerancia de micotoxinas en alimentos para consumo humano y animal.

Tabla I. Límites de tolerancia para Deoxynivalenol, Zearalenona, Fumonisinias, Aflatoxina B₁ y Aflatoxinas totales, según FAO (2003).

Micotoxina	Límites de tolerancia	Proporción del total de países encuestados
	Ppb	(%)
Deoxynivalenol	750 a 1000	76
Zearalenona	200 a 1000	87
Fumonisinias	1000	67
Aflatoxina B1	2 a 5	70
Aflatoxinas totales	4 a 20	87

A nivel regional (Mercosur) y Nacional, existe reglamentación circunscripta a los niveles de aflatoxina y DON. En ambas reglamentaciones los límites máximos admisibles de AF son 20 ppb para alimentos destinados a humanos y animales (Decreto MSP 155/006). En referencia al DON, el MGAP (Resolución Ministerial del 26/12/01) estableció en 5ppm los niveles máximos de tolerancia en alimentos para animales y materias primas para raciones. Esto concuerda con el valor máximo admisible por la FDA y con trabajos previos (Hamilton *et al.*, 1985; Dänicke *et al.*, 2001a; Hulan & Proudfoot, 1982) que comprobaron que esta dosis era tóxica para aves.

Estos valores se han definido a partir de trabajos experimentales en los que se estudió el efecto de la adición de distintos niveles de micotoxinas puras en el comportamiento animal. Estos trabajos han sido compilados por Watts *et al.*, (2003), quien reporta que las dosis tóxicas para aves serían: 0.2 ppm de AFB₁, 16 ppm de DON, 75 ppm de FB₁ y 800 ppm de zearalenona.

Hoy en día, existen recomendaciones más estrictas cuando la meta es evitar la incidencia de estas toxinas en la salud de los animales. Así Mallmann (2009) plantea la total ausencia de aflatoxinas, y máximos de 100 ppb de fumonisinina y 200 ppb de DON en las raciones destinadas a pollos parrilleros de 0 a 3 semanas, recomendando como norma general, la inclusión de AAM, en todas las dietas en la fase inicial.

2.3. Aditivos antimicotoxinas

Hay numerosos estudios en los que se emplean compuestos orgánicos e inorgánicos, intentando disminuir la magnitud de las micotoxicosis por medio de métodos físicos, químicos y biológicos (Ramos *et al.*, 1996; Binder 2000). Dentro de los métodos físicos, se incluyen inactivación térmica, radiaciones gamma, separación por densidad, extracción por solventes y la adsorción con diferentes sustancias (Sammarajeewa *et al.*, 1990; Santin *et al.*, 2003a; Devegowda & Murthy,

2005). Los métodos químicos consisten en degradar la estructura molecular de las micotoxinas o inactivarlas mediante el uso de ácidos, bases, aldehídos, agentes oxidantes y/o gases varios como amoníaco (Dwyer *et al.*, 1997; Mc Kenzie *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2000; Santin *et al.*, 2003a; Tedesco *et al.*, 2004). Los métodos biológicos comprenden el uso de microorganismos tales como levaduras, hongos, algas y bacterias para modificar y/o inactivar las toxinas fúngicas (Stanley *et al.*, 1993; El Nezami *et al.*, 2001; Santin *et al.*, 2003a; Tejada *et al.*, 2008). Se incluyen en estos métodos biológicos, los glucomananos provenientes de las células de la pared de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Muchas de estas alternativas son impracticables a gran escala debido al costo y a la poca practicidad. Un avance en esta problemática, ha sido el empleo de aditivos anti micotoxinas (AAM) que secuestran las toxinas o las transforman, reduciendo su absorción desde el tracto gastrointestinal (Scheideler *et al.*, 1993; Santurio, 2000).

Los AAM son polímeros inorgánicos u orgánicos de gran peso molecular, que al añadirse a las raciones, son capaces de formar complejos irreversibles con las moléculas de micotoxinas en la luz intestinal. Tales complejos son indigestibles, atravesando el tracto digestivo sin ser absorbidas, y excretándose en las heces. Como resultado de su acción, hay una reducción de la dosis de micotoxinas absorbidas, (Devegowda & Murthy, 2005; Campos & Malaquido, 2003; Díaz & Smith, 2005), pero se reconoce que ningún AAM es capaz de atrapar o inactivar el 100% de la toxina presente en el alimento (Santin *et al.*, 2003a; Devegowda & Murthy, 2005).

En el mercado actual del Uruguay, existen como alternativa de detoxificación de micotoxinas AAM de diversos tipos y con diferentes mecanismos de acción. Entre los AAM disponibles se encuentran AAM inorgánicos tales como los aluminosilicato de sodio y calcio hidratado (HSCAS), AAM orgánicos tales como los glucomananos esterificados (EGM) y mixtos como aditivo multimodular (MM) integrado por fracción inorgánica y compuestos orgánicos.

Los productos inorgánicos usados como adsorbentes o secuestrantes son derivados de carbón activado (Dalvi *et al.*, 1983; Dalvi *et al.*, 1984; Edrington *et al.*, 1997) de las bentonitas (Kececi *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 1989; Miazzo *et al.*, 2001; Miazzo *et al.*, 2005; Desheng *et al.*, 2005; Morbini *et al.*, 2006), de la montmorillonita (Bailey *et al.*, 1998; Desheng *et al.*, 2005), de zeolitas naturales (Willis *et al.*, 1982), sintéticas (Miazzo *et al.*, 2000) y de tierra de diatomeas (Denli *et al.*, 2009).

Los HSCAS son derivados de las zeolitas, considerados como inocuos y están incluidos en la categoría Generally Recognized As Safe (GRAS) (Scheideler *et al.*, 1993; Investigación aplicada 1996; Pimpukdee *et al.*, 2004). Estos aditivos se activarían al ponerse en contacto con los jugos digestivos, formando complejos insolubles y estables con las micotoxinas, no permitiendo de esta manera que éstas se absorban en el tracto gastrointestinal (Díaz & Smith, 2005). Las micotoxinas se ligarían por cargas

eléctricas al aluminosilicato, ya que éste AAM tiene carga eléctrica negativa lo que atrae compuestos catiónicos como las aflatoxinas (Ramos *et al.*, 1996; Devewogda *et al.*, 1998). La unión entre el AAM y la toxina se produciría entre β -keto lactona o bi lactona de la aflatoxina con los iones metálicos de las HSCAS (Phillips *et al.*, 1990; Devewogda & Murthy, 2005).

El primer reporte del uso de HSCAS para adsorber aflatoxinas fue realizado en 1987 (Davidson *et al.*, 1987; Phillips *et al.*, 1987), existiendo numerosos reportes que demuestran su efecto detoxificante sobre la aflatoxina B₁ y su metabolito M₁ (Ramos *et al.*, 1996). Hay estudios en aves (Kubena *et al.*, 1990a; Kubena *et al.*, 1990b; Kubena *et al.*, 1991; Kubena *et al.*, 1993a y b; Abo-Norag, 1995; Kubena *et al.*, 1998; Ledoux *et al.*, 1999; Pimpukdee *et al.*, 2004), bovinos de leche (Harvey *et al.*, 1991b), cabras lactantes (Smith *et al.*, 1994), corderos (Harvey *et al.*, 1991a) y cerdos (Harvey *et al.* 1994; Linderman *et al.*, 1993). Estos aditivos tienen como desventaja la posibilidad de adsorber minerales, vitaminas y coccidiostáticos (Chung *et al.*, 1990; Smith 1997; Devewogda *et al.*, 1998; Santin *et al.*, 2003a) y un escaso margen de eficiencia secuestrante ya que solo las aflatoxinas se secuestran significativamente (Devewogda *et al.*, 1998; Osweiler 2000) siendo su valor limitado o ineficaz para trichotecenos (Kubena 1990 y 1993; Dänicke *et al.*, 2004), zearalenona (Bursian *et al.*, 1992; Díaz & Smith 2005), fumonisina (Ramos *et al.*, 1996; Osweiler, 2000) y ochratoxinas (Huff *et al.*, 1992; Santin *et al.*, 2002). Estos aditivos tienen además el inconveniente que deben ser incluidos en altas concentraciones en las dietas, lo que produciría una disminución en la disponibilidad de importantes micronutrientes (Huwing *et al.*, 2001).

Los EGM se obtienen a partir de la esterilización de la pared celular de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Inicialmente los cultivos de la cepa 1026 de estas levaduras, fueron utilizados como suplemento nutricional, comprobándose que al adicionarlos a las dietas de pollos se obtenía una mejor performance (Stanley *et al.*, 1993). Las células de la pared de las levaduras mejorarían la mucosa intestinal, a esto se debería el aumento de peso constatado en los animales que las ingirieron (Santin *et al.*, 2001). También se comprobó que actuaban con efecto secuestrante de micotoxinas, contribuyendo a su capacidad como promotores de crecimiento (Bradley *et al.*, 1993) y probióticos (Brenes *et al.*, 1993; Spring *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2005).

La pared celular de estas levaduras está formada por polisacáridos (glucosa, manosa y nacetyl glucosalina) y glicoproteínas dispuestas en forma de red tridimensional con una estructura dinámica (Díaz & Smith 2005; Chowdhury *et al.*, 2005b; Morales 2007). Aunque el modo de acción de los EGM todavía no es del todo conocido, hay hipótesis que las micotoxinas serían atrapadas en la matriz del glucomannano en el tubo gastrointestinal, lo que impediría su posterior absorción (Raju & Davegowda 2000). Esta capacidad de absorción de micotoxinas se vería favorecida por la disposición tridimensional de los polisacáridos y su naturaleza porosa, por lo que serían efectivas para contrarrestar micotoxinas tales como aflatoxina, zearalenona y ochratoxina (Yianninkouris *et al.*, 2004).

Los EGM han demostrado ser efectivos aún cuando se incluyen en raciones a bajas concentraciones, lo que representaría una ventaja sobre los aditivos inorgánicos (Díaz *et al.*, 2005). Como ventaja complementaria, los EGM tendrían un alto grado de antigenicidad, produciendo un aumento de la respuesta inmune en los animales, habiéndose encontrado (Devewogda, 1998; Smith *et al.*, 2001) mejoras en los títulos de anticuerpos y protección en los parámetros que se ven afectados por aflatoxinas en aves. Adicionalmente suplementarían con enzimas formadas por las levaduras, las que contribuirían a mejorar la utilización de los alimentos al acelerar la transformación de ciertos tóxicos y disminuir la duración e intensidad de los efectos de los mismos (Dalvi *et al.*, 1984). Este efecto beneficioso de los EGM en animales consumiendo dietas con aflatoxinas, estaría asociado a la influencia del pH y concentración de fosfato en el medio. Estudios "*in vitro*" han mostrado que la máxima adsorción de las aflatoxinas a la pared de las levaduras se daría a pH 4 y a una concentración de fosfato de 0.5 M, condiciones que son normales en el tubo gastrointestinal (Díaz *et al.*, 2005).

La efectividad detoxificante de estos aditivos con dietas artificialmente contaminadas con aflatoxina B₁ fue demostrada en pollos (Stanley *et al.*, 1993; Aravind *et al.*, 2003; Santin *et al.*, 2003b; Arrieta *et al.*, 2006b) y gallinas ponedoras, disminuyendo los residuos de toxina que pasan a los huevos (Zaghini *et al.*, 2005) y mejorando la inmuno supresión (Stanley *et al.*, 1993; Devegowda *et al.*, 1998). Del mismo modo, Devewogda *et al.*, (1998), reportaron efectos beneficiosos al suplementar a reproductoras pesadas, observándose que atenuó el descenso en la producción de huevos provocado por la toxina. Adicionalmente Santurio *et al.*, (1999), encontraron lesiones hepáticas de menor magnitud y en áreas más restringidas, en aves que consumían raciones contaminadas con aflatoxina B₁.

Se ha constatado que los EGM también secuestran efectivamente algunos trichotecenos, contrarrestando algunos de los efectos que producen estas toxinas, como la disminución en la ganancia de peso. También se ha reportado que actúan previniendo parcialmente los cambios neuroquímicos (mejorando las concentraciones de norepinefrina, dopamina y otros mediadores), que inciden en la ingestión voluntaria de alimento (Smith *et al.*, 2001; Swamy *et al.*, 2002 b; Girish *et al.*, 2008c). Complementariamente, atenuarían los efectos que producen estas toxinas en algunos valores séricos de función hepática y renal, así como en los parámetros hematológicos alterados y en los títulos de anticuerpos (Raju & Devegowda, 2000; Faixová *et al.*, 2007b) de aves consumiendo dietas contaminadas. Se ha comprobado también que los EGM protegerían los niveles de los sistemas antioxidantes celulares, por lo que serían eficaces para prevenir la peroxidación lipídica en el hígado (Dvorska & Surai, 2001; Landeros, 2008). Hay datos sobre la efectividad "*in vivo*" de EGM en suinos, (Swammy *et al.*, 2002b, 2003) equinos, (Raymond *et al.*, 2003) y bovinos (Korosteleva *et al.*, 2007) consumiendo raciones contaminadas con micotoxinas producidas por *Fusarium*.

Sin embargo, Arrieta *et al.* (2006b y 2007) sugieren que el consumo de extractos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* podría ser hepatotóxico, pudiendo producir alteraciones histológicas y funcionales del hígado.

El MM está formado por minerales, enzimas, microorganismos, sustancias fitogénicas y constituyentes ficolíticos. La fracción mineral está constituida por una mezcla de minerales que actúan sinérgicamente en la adsorción selectiva y estable de las micotoxinas polares, principalmente aflatoxinas (Kececi *et al.*, 1998; Kiran *et al.*, 1998; Celik *et al.*, 2000; Gargees & Shareef 2008) y fumonisinas cuando se dan condiciones tales como un pH ácido (Starkl 2008). Estos productos tendrían la ventaja que la adsorción de nutrientes y antibióticos sería muy baja lo que representaría una ventaja frente a los HSCAS (Starkl 2008). La fracción biológica está compuesta por enzimas que serían capaces de inactivar las micotoxinas poco polares (por ejemplo las toxinas del género *Fusarium*), degradando sus grupos funcionales (como el 12-13 epoxi de los trichotecenos) (Díaz G., 2002 y 2005) o hidrolizando enlaces éster, (como zearalenona), convirtiéndolas en metabolitos inactivos y no tóxicos (Dänicke *et al.*, 2003). La fracción microbiana, incluye bacterias encapsuladas del género *Eubacterium* (*Eubacterium* BBSH 797), que se obtienen del rumen de bovinos. Estos microorganismos tendrían la capacidad de proliferar rápidamente en el tracto gastrointestinal y producir un sistema enzimático que neutralizaría e inactivaría las micotoxinas por biotransformación. Las enzimas específicas que producen, llamadas de-epoxidadas, cambiarían el anillo epóxido, a un metabolito no-tóxico transformándolo en dieno (Díaz *et al.*, 2005). Este sería un método efectivo para contrarrestar micotoxinas que tienen una menor capacidad de ser adsorbidas a los AAM inorgánicos, tales como trichotecenos, zearalenona y ochratoxina A. Complementariamente, estos microorganismos evitarían que bacterias patógenas se implantaran en el tracto gastrointestinal por exclusión (Mycifix Plus 3.0®). La cuarta fracción está formada por extractos de plantas que contienen flavonolignanos, saponinas y terpenoides. Los flavonolignanos actuarían como hepatoprotectores, impidiendo que las toxinas penetren las membranas celulares del hígado. Las saponinas y los terpenoides actuarían en la protección de las mucosas. Por último, los constituyentes ficolíticos (formados por extractos de algas inmunoestimulantes) actuarían fortaleciendo la respuesta del sistema inmunológico natural compensando los efectos supresores de las micotoxinas. También regularían las funciones metabólicas, coadyuvando de esta manera en la síntesis del ARN y en la interconversión y catabolismo de los aminoácidos.

La efectividad detoxificante de MM se ha reportado en aves que consumieron dietas artificialmente contaminadas con aflatoxinas (Kececi *et al.*, 1998; Kiran *et al.*, 1998; Celik *et al.*, 2000), trichotecenos como 4,15-diacetoxiscirpenol (Díaz *et al.*, 2002); T-2 (Díaz *et al.*, 2005); DON (Horea 2005); fumonisinas (Starkl 2008) y ochratoxinas (Horea, 2005; Hanif *et al.*, 2008). Dänike *et al.* 2002) han mostrado un escaso efecto protector de este aditivo para zearalenona. También existen datos (Dänicke *et al.*, 2004) que indican que la adsorción de zearalenona y DON “*in vitro*” al aditivo, es baja y

que la presencia de epoxidasa no sería suficiente para desdoblar el anillo epóxido característico de los trichotecenos.

2.4 DIETAS NATURALMENTE CONTAMINADAS

Los parámetros serológicos y hematológicos, así como la performance de las aves pueden deprimirse por la combinación de pequeñas concentraciones de micotoxinas presentes en alimentos naturalmente contaminados a niveles inferiores de los tradicionalmente propuestos como tóxicos (Smith *et al.*, 2001). Esto se produciría por el efecto aditivo y/o sinérgico entre las micotoxinas a bajos niveles individuales que potenciarían su acción (Chowdhury *et al.*, 2004).

La efectividad de los AAM en secuestrar o inactivar micotoxinas específicas ha sido evaluada en dietas artificialmente contaminadas con micotoxinas presentes en niveles reconocidos como tóxicos. En estos últimos años ha sido de interés estudiar su efectividad en dietas naturalmente contaminadas, en las que se encuentran mezclas de varias micotoxinas a niveles muy inferiores a lo aceptado tradicionalmente como tóxico pues esta situación se asemeja más a lo que ocurre en la realidad (Santin, 2003; Swamy *et al.*, 2002a; Girish *et al.*, 2008a).

En la tabla II se presenta un resumen de estudios realizados en aves en los cuales se evaluó la capacidad de AAM para contrarrestar los efectos adversos de distintas micotoxinas suministradas a aves.

Tabla II. Efectos de la inclusión de aluminosilicato de calcio y sodio hidratado (HSCAS), glucomananos esterificados (EGM) y aditivo multimodular (MM) en dietas para aves naturalmente contaminadas con micotoxinas.

AAM	Micotoxina	Concentración	Efecto negativo respecto al grupo control (sin micotoxinas)	Beneficio de incluir AMM	Autor
HSCAS 1%	DON	1 ppm			
Parrilleros	Fumonisina B	5 ppm	↓ peso	s/e	
21 días	Aflatoxina B ₁	100 ppb	↓ albúmina	s/e	<i>Watts et al., 2003</i>
	Zearalenona	1 ppm	↓ globulina	s/e	
	Ocratoxina A	0,5 ppm	↓ Ca sérico	s/e	
	Moniliformina	5 ppm			
EGM 0,05%	Aflatoxina B ₁	168 ppb	↓ peso	↑ peso	
Parrilleros	Ochratoxina	8,4 ppb	↑ GGT	↓ GGT	<i>Aravind et al., 2003</i>
35 días	Zearalenona	54 ppb	↓ BUN	↑ BUN	
	T-2	32 ppb			
EGM 0,20%	DON	9,7 ppm	Enrojecimiento pecho	Mejora el enrojecimiento	
Parrilleros	Acido Fusárico	21,6 ppm	↓ peso (luego 42 días)	s/e peso	<i>Swamy et al., 2002</i>
56 días	Zearalenona	0,8 ppm	↓ albúmina	↑ albúmina	
			↑ ácido úrico	↓ ácido úrico	
			Efecto en la inmunidad	Mejora la inmunidad	
EGM 0,20%	DON	9,5 ppm			
Parrilleros	FA	21,4 ppm	↓ peso (21 días - 42 días)	s/e	<i>Swamy et al., 2004</i>
56 días	Zearalenona	0,7 ppm	↓ n° de linfocitos B	Previene la ↓ de linfocitos B	
	15 Acetyl DON	0,5 ppm			
EGM 0,20%	DON	12,1 ppm			
Ponedoras	15 Acetyl DON	0,5 ppm	↓ peso (hasta semana 4)	↑ peso	
45 semanas de edad durante 12 semanas	Zearalenona	0,6 ppm	↓ postura (entre 4 y 8 semanas)	↑ postura	<i>Chowdhury et al., 2004</i>
			↑ ácido úrico	↓ ácido úrico	
			↓ albúmina/colesterol	s/e	
EGM 0,2%	DON	11,7 ppm			
Ponedoras	15 Acetyl DON	0,4	↓ tasa de síntesis fraccional de proteínas en hígado	s/e para contrarrestar esta reducción	<i>Chowdhury et al., 2005</i>
32 semanas edad durante 4 semanas	Zearalenona	0,6 ppm	↓ parámetros productivos	Recuperación parcial de parámetros productivos	
EGM 0,2%	DON	12,1 ppm	↓ leve hematocrito	s/e	
Ponedoras	15 Acetyl DON	0,5 ppm	↓ n° total de linfocitos	Previene la ↓ de linfocitos B y de IgA	<i>Chowdhury et al., 2005</i>
45 semanas edad durante 12 semanas	Zearalenona	0,6 ppm			
EGM 0,2%	DON	2,8 ppm	↓ proteínas totales	↑ proteínas séricas	
Pavos	15 Acetyl DON	0,2	↑ ácido úrico	↓ ácido úrico	<i>Girish et al., 2008a</i>
12 semanas	Zearalenona	0,2	↓ el peso (crecimiento y desarrollo)	↑ el peso	
			Afecta parámetros inmunológicos	Previene algunas alteraciones de estos parámetros	
EGM 0,2%	DON	2,8 ppm	Altera los índices morfológicos de las vellosidades intestinales	Previene esos efectos	<i>Girish et al., 2008b</i>
Pavos 0 a 3 iniciador	15 Acetyl DON	0,2 ppm	Altera menos los índices		
Pavos 4 a 6 crecimiento	Zearalenona	0,2 ppm	No altera los índices		
Pavos 7 a 9 desarrollo	Acido Fusárico	10,2 ppm	No altera los índices		
Pavos 10 a 12 terminador	DON	3,3 ppm			
EGM 0,2%	15 Acetyl DON	0,2 ppm	Altera la concentración de neurotransmisores en puente serotoninérgico	Parcialmente inhibió esos efectos	<i>Girish et al., 2008 c</i>
Pavos	Acido Fusárico	12,4 ppm			
6sem	DON	17,63	↓ hematocrito	↑ hematocrito	
MM	15 Acetyl DON	5,5	↓ peso	s/e	<i>Dänicke et al., 2002</i>
Ponedoras	Zearalenona	1,6	↓ consumo	s/e	
28 semanas edad durante 12 semanas	Fumonisina	<100	↓ postura	s/e	

* HSCAS: aluminosilicato de calcio y sodio hidratados; EGM: glucomananos esterificados; MM: multimodular; s/e: sin efecto; GGT: Gamma-glutamil transpeptidasa; BUN nitrógeno ureico en sangre s/e: sin efecto.

Los antecedentes sugieren que la adición de HSCAS a dietas con mezclas de micotoxinas, aún cuando estén presentes aflatoxinas, no mejorarían las variables afectadas por las mismas (Watts *et al.*, 2003; Tabla II). Esto podría estar relacionado a su mecanismo de acción, por el que solo se formarían complejos entre iones metálicos de las HSCAS y las quetolactonas de las aflatoxinas, siendo pobre la formación de estos complejos con otras micotoxinas (Phillips *et al.*, 1988; Watts *et al.*, 2003).

En contraposición, los EGM se han reportado como efectivos para disminuir algunos efectos tóxicos en pollos parrilleros (Swamy *et al.*, 2002; 2004; Aravind *et al.*, 2003), pavos (Chowdhury *et al.*, 2005 b; Girish *et al.*, 2008a, b y c), y gallinas ponedoras (Chowdhury *et al.*, 2004), consumiendo alimentos naturalmente contaminados con múltiples micotoxinas (Tabla II)

En experimentos con pollos (Dänicke *et al.*, 2003) y gallinas ponedoras (Dänicke *et al.*, 2002) que recibieron dieta naturalmente contaminada con micotoxinas de *Fusarium* concluyeron que MM no fueron efectivos para contrarrestar la mayoría de los efectos negativos causados por estas. Tampoco mostraron efectividad para contrarrestar los efectos negativos de dietas naturalmente contaminadas por micotoxinas de *Fusarium* en patos (Chowdhury *et al.*, 2005 a).

No se encontraron antecedentes de estudios de eficacia “*in vivo*” que comparaen en forma simultánea la capacidad de detoxificación de HSCAS, EGM y MM en pollos parrilleros consumiendo dietas naturalmente contaminados con micotoxinas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Las micotoxinas implican enormes pérdidas de orden económico, sanitario y comercial (Zaviezo & Contreras, 2005). El mayor daño se atribuye a lesiones subclínicas ocasionadas en órganos y sistemas, lo que llevaría a una disminución del rendimiento productivo (Mabbett, 2004; Wyatt, 2005). En condiciones prácticas no hay alimentos para aves completamente libres de micotoxinas, lo cual constituye un problema comercial importante ya que se ha demostrado que combinaciones de micotoxinas a bajas concentraciones pueden tener efectos negativos en las aves (disminución de la performance productiva y alteración de los valores hematológicos y serológicos) aún cuando las concentraciones de toxinas individuales sean menores a las concentraciones que producen efectos negativos (Kubena *et al.*, 1995; Devegowda, 2005; Wyatt, 2005). Frente a esta problemática los AAM se presentan como una alternativa de detoxificación.

3.1 Hipótesis

La inclusión de MM, EGM y HSCAS en dietas naturalmente contaminadas con aflatoxinas, fumonisina, DON y/o zearalenona modificaría favorablemente los valores séricos (LDH, proteínas totales, albúmina, ácido úrico y colesterol) y hematológicos (Hb, Hto y la concentración de hemoglobina corpuscular media MCHC) de pollos parrilleros.

3.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de incluir AAM en raciones naturalmente contaminadas con micotoxinas en algunos parámetros séricos y hematológicos indicativos de actividad detoxificadora en pollos parrilleros.

3.3 Objetivo específico

Evaluar la inclusión de MM, EGM y HSCAS en dietas naturalmente contaminadas con aflatoxinas, fumonisina, DON y/o zearalenona en los valores séricos (LDH, proteínas totales, albúmina, ácido úrico y colesterol) y hematológicos (Hb, Hto y MCHC) de pollos parrilleros.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo del manejo de los animales durante la experimentación fue revisado y aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República. Los procedimientos fueron realizados de acuerdo a la Guía de Buenas Prácticas para el uso de animales en investigación, pruebas y enseñanza de la Universidad de la República (Diario Oficial N° 25.467, 2000).

4.1. Ubicación geográfica del estudio

La investigación se realizó en un establecimiento comercial ubicado en la Localidad de San Bautista en el departamento de Canelones (Uruguay), en el período Noviembre - Diciembre 2005.

4.2. Acondicionamiento del galpón

La semana previa al trabajo experimental el galpón fue prolijamente lavado y desinfectado y se delimitó el área de experimentación dentro del mismo. Esta consistió en dos filas de cuatro corrales de experimentación (2 x 1,5 m c/u) cada una, separadas entre sí por un pasillo de un metro de ancho. Cada fila correspondió a un experimento y recibió una dieta tratamiento. Cada corral estaba cercado con una malla de plástico duro de 70 cm de altura. El piso fue cubierto con cáscara de arroz con una profundidad de 5 cm. Esta área de experimentación fue rodeada en su totalidad por cortinas de plastillera que prendían de tirantes de madera desde el techo del galpón formando así "una carpa" lo que favoreció a crear el microclima adecuado y conservar la temperatura (promedio 30°C)

adecuada para alojar pollos en los primeros días de vida. El galpón fue calefaccionado con 24 horas de anticipación a la llegada de las aves para proporcionar la temperatura adecuada en toda el área antes del arribo de los mismos. Se realizó manejo constante de estas cortinas para permitir una adecuada ventilación. La temperatura ambiente se monitoreó permanentemente por tres termómetros colgados a diferentes alturas dentro del área de experimentación.

4.3. Animales de experimentación

De una incubaduría comercial se obtuvieron 160 pollitos parrilleros no sexados de un día de edad de línea comercial ROSS, asignándose por sorteo 20 animales a cada tratamiento. El nivel de consumo definido fue *ad libitum*, las aves tuvieron acceso libre y continuo a agua de buena calidad, fueron mantenidas en un plan de 24 horas de luz y fuente de calor continua con un monitoreo permanente de la temperatura ambiente. Las aves se controlaron diariamente para evaluar signos de confort térmico, enfermedad, o constatar mortalidad.

4.4. Preparación de las dietas

Los corrales se dividieron al azar en dos grupos, asignándose a cada grupo una dieta naturalmente contaminada con micotoxinas. Las dietas asignadas diferían entre sí en las micotoxinas presentes, o en la concentración de las mismas. Para la elaboración de las dietas experimentales se empleó una fórmula comercial (aprobada por la Dirección de Servicios Agronómicos del MGAP) denominada "Iniciador Parrillero" (Tabla III). La fórmula establecía que la ración contenía un mínimo de 21 de proteína cruda y 3% de extracto al éter, un máximo de 12.5% de humedad, 5% de fibra cruda, 6.5% de minerales totales y 0.6% de cloruro de sodio; un mínimo y un máximo de calcio (0.9 y 1.3%, respectivamente) y fósforo (0.7 y 1.05%, respectivamente) y un máximo de 0.03% de cornezuelo de centeno. En un mismo molino, se elaboraron simultáneamente y con los mismos alimentos las dos dietas evaluadas cuya única diferencia consistió en el origen de los granos de maíz que se emplearon.

Se elaboró un plan de muestreo por el que se tomaron muestras representativas de distintos sectores de las raciones (Whitaker 2005), formándose muestra compuesta para la determinación de micotoxinas de cada ración.

Tabla III Composición de la dieta que se usó en ambos experimentos.

ALIMENTO	Kgs
Maíz	598,0
Soja	290,0
Harina de Carne	130,0
Sebo	20,0
Cloruro de sodio	2,0
Metionina	1,6
Lisina	1,5
Coccidiostático	0,6
Núcleo vitamínico mineral	1,0

4.5. Determinaciones de Micotoxinas

En las dos muestras de raciones, las detecciones de micotoxinas fueron realizadas en la Sección Toxicología del Departamento de Patobiología de la División Laboratorios Veterinarios Dr. Miguel C. Rubino (MGAP) Montevideo, Uruguay. Allí se realizaron las detecciones para: DON, zearalenona, T-2 y ochratoxina. Estas fueron realizadas por Cromatografía en Capa Fina (TLC), utilizándose columnas de limpieza Romer 224 para aflatoxina y zearalenona, y Romer 225 para DON y T-2. Se sembraron los extractos de las muestras y patrones de concentración conocida, en placas de sílica-gel (Sil G. Alugran®, Macherey-Nagel, Ref 818-033). Luego de realizadas las cromatografías bidireccionales se observaron bajo luz U.V. y se cuantificaron. Los límites de detección de esta técnica son: 500 ppb para deoxynivalenol, 500 ppb para zearalenona, 125 ppb para T-2 y 10 ppb para ocratoxina.

Para la determinación de aflatoxinas se enviaron muestras de las dos raciones al Departamento de Toxinas Naturales del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), donde se determinaron: aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 individuales y totales. La determinación se realizó por TLC (AOAC 2005 met 970.45).

4.6. AAM evaluados

Los AAM evaluados fueron: HSCAS, EGM, y MM

La composición del HSCAS utilizado en estos experimentos es: Dióxido de Silicio, Óxido de Aluminio, Óxido de Hierro, Óxido de Calcio, Óxido de Magnesio, Óxido de Sodio, Óxido de Potasio (Sintox® Allinat).

Los EGM se obtienen a partir de la esterilización de la pared celular de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Mycosorb® Alltech).

El MM está formado por minerales, enzimas, microorganismos, sustancias fitogénicas y constituyentes ficolíticos (Mycofix® Plus 3.0 Biomin).

4.7. Tratamientos evaluados

En dos experimentos simultáneos y de igual duración (21 días) se evaluaron dos raciones con diferentes combinaciones de micotoxinas. Las aves comenzaron a consumir las dietas tratamiento una vez que llegaron al predio. La ración 1 (Experimento 1), contenía 4.6 ppb de aflatoxina B₁, 1.1 ppb de aflatoxina B₂ y 4.5 ppm de fumonisina. La ración 2 (Experimento 2), contenía 500 ppb de zearalenona, 500 ppb de DON, y 1.2 ppm de fumonisina. Cada una de estas raciones se combinó con cada uno de los AAM evaluados los cuales se incluyeron en las raciones en los niveles máximos recomendados por los fabricantes, quedando un grupo control sin el agregado de AAM. De esta forma se evaluó el efecto de tres AAM en relación a un control. Ambos experimentos fueron simultáneos y tuvieron una duración de 21 días, asignándose a cada tratamiento en forma aleatoria una unidad de experimentación de 20 animales

Los **tratamientos** evaluados en **cada uno de los experimentos** fueron:

Tratamiento sin AAM = Ración contaminada + 0% de AAM

Tratamiento MM = Ración contaminada+ 1,5% de MM

Tratamiento EGM = Ración contaminada+ 0,2% de EGM

Tratamiento HSCAS = Ración contaminada + 0,5 % HSCAS

4.8. Parámetros evaluados

A los 21 días de edad, en condiciones de ayuno de 6 horas, se extrajo de cada animal 1 ml de sangre intra cardíaca por la técnica de punción cardíaca por el flanco izquierdo. Para esto se utilizaron jeringas descartables de 5 ml con aguja 21G. Posteriormente los pollos fueron sacrificados por el método de dislocación cervical

Las muestras de sangre obtenidas de cada animal fueron colectadas en dos grupos de tubos. En un grupo - en las que se determinaron valores hematológicos - se usaron tubos Tap-Val® con etilen diamino tetra acético (EDTA) como anticoagulante. La otra mitad de las muestras, donde se realizaron determinaciones serológicas, fueron colectadas en tubos sin anticoagulante. En el laboratorio, las muestras sin anticoagulante fueron rápidamente centrifugadas para obtener el suero y conservadas a -20° C hasta que se realizaron las cuantificaciones correspondientes. Todas las determinaciones fueron realizadas en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria (UdelaR).

En cada experimento se evaluaron valores séricos (proteínas totales, albúmina, ácido úrico, colesterol, y actividad de lactato deshidrogenasa), valores hematológicos (hematocrito, hemoglobina, y en base a ellos se calculó la MCHC), Adicionalmente se determinó en forma individual el peso corporal a los 7, 14 y 21 días de vida. Se registraron las muertes que ocurrieron en los diferentes lotes (un pollito en el tratamiento MM y dos del tratamiento HSCAS en el experimento 1, y dos pollitos en el tratamiento MM en el experimento 2) las que se produjeron en su totalidad dentro de la primer semana de vida, no realizándose autopsia en los mismos.

En el suero se realizaron técnicas de determinación cuantitativa de acuerdo a las recomendaciones establecidas en los Kits comerciales (Bio Systems® España) con lectura en espectrofotómetro. Estas técnicas fueron: actividad de la deshidrogenasa láctica por método ultravioleta optimizado DGK (lectura a 340 nm). (IFCC, 1994) proteínas totales por método colorimétrico de Biuret (lectura a 540 nm) (Doumas, 1995) albúmina por método colorimétrico de verde de Bromocresol (BCG en medio tamponado a pH 3.8 lectura a 625 nm) Johnson *et al.*, (1999) ácido úrico por técnica enzimática del punto final de Trinder (lectura a 505 nm) (Newman & Price, 1999), colesterol por la técnica enzimática colorimétrica de Alain, (lectura 505 nm), (Rifal *et al.*, 1999). Para realizar estas determinaciones se utilizó un fotómetro con filtro interferencial. Humalizer Junior (HUMAN GmbH, Germany). A las muestras con anticoagulante se les hicieron las siguientes determinaciones: Hematocrito (Hto), Hemoglobina (Hb) y en base a ellos se calculó el Índice Hematimétrico de Hemoglobina Corpuscular Media (MCHC) expresada en g/dl. Para Hto se usó la técnica del micro hematocrito (Bounus & Stedman, 2000) expresándose el resultado como porcentaje. Se utilizaron tubos capilares que fueron centrifugados 5 minutos en centrifuga Hawksley Micro-haematocrit a 10000 rpm. Para el cálculo de Hemoglobina, se usó la técnica de Cianuro de Hemoglobina (pH 7,2 con lectura en espectrofotómetro a 540 nm) expresándose en g/dl. (Bounus & Stedman, 2000).

Los pesos de los animales se monitorearon a los 7, 14 y 21 días posteriores al inicio del consumo de las dietas tratamiento

4.9. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron en un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial (2 raciones X 3 AAM) empleando un procedimiento mixto (raciones como efecto fijo y AAM como efecto aleatorio) del SAS (PROC MIXED) (SAS Institute., Inc., Cary, NC) con grados de libertad ajustados por el método Kenward - Roger. Para el análisis de los resultados hematológicos y serológicos cada pollo fue considerado una unidad experimental. Para el análisis de los pesos en las distintas fechas se consideró el corral como unidad experimental. Las diferencias entre tratamientos se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$, y las diferencias entre medias con valores de $P > 0,05$ y $\leq 0,10$ se aceptaron como tendencias a diferencias.

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + R_i + T_j + R_i \times T_j + E_{ij}$$

Y_{ij} = Respuesta

μ = media general

R_i = Ración

T_j = Tratamiento

E_{ij} = Error

5. RESULTADOS

En la tabla IV se presentan los resultados de los experimentos 1 y 2. Para todas las variables séricas y hematológicas se detectó una interacción ($P < 0.001$) entre la ración (combinación de micotoxinas) y el AAM incluido en la misma.

En ambos experimentos, la inclusión de los AAM produjo respuestas diferentes en los parámetros indicadores de funcionamiento hepático (proteínas totales, albúmina, ácido úrico y colesterol), de daño tisular (LDH), y de las variables hematológicas (hemoglobina, hematocrito y concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) con respecto a los animales que habían consumido la dieta sin AAM.

En el experimento 1, en el suero de los animales que consumían las raciones con AAM presentaron concentraciones menores ($P < .0001$) de LDH y ácido úrico y mayores ($P < .0001$) valores de proteínas totales y colesterol. Se registró una respuesta diferencial en las concentraciones séricas de albúmina, observándose mayores ($P < 0.0001$) valores en los pollos consumiendo las raciones con MM y EGM respecto al grupo control mientras que el grupo consumiendo HSCAS mostró menores ($P < 0.02$) concentraciones que el grupo control.

Tabla IV. Variables séricas y hematológicas y peso vivo de pollos parrilleros consumiendo raciones naturalmente contaminadas (Experimento 1: 4.6 ppb de aflatoxina B₁, 1.1 ppb de aflatoxina B₂ y 4.5 ppm de fumonisina; Experimento 2: 500 ppb de zearalenona, 500 ppb de DON, y 1.2 ppm de fumonisina) sin y con el agregado de AAM.

	Experimento 1				Experimento 2				CME	Significancia
	C	MM	EGM	HSCAS	C	MM	EGM	HSCAS		
n	20	19	20	18	20	18	20	20		
Variables séricas										
Lactato										
deshidrogenasa, UI/l	335.0 a	207.7 c	204.1 c	245.7 b	252.4 b	171.3 d	203.0 c	246.3 b	11.5	***
Proteína Total, g/dl	3.0 b	3.4 a	3.3 a	3.3 a	2.7 c	3.1 b	2.7 c	2.4 d	0.1	***
Albúmina, g/dl	1.6 c	2.0 b	2.1 b	1.3 d	1.6 c	2.5 a	1.7 c	1.7 c	0.1	***
Ácido úrico, mg/dl	6.2 a	3.4 c	2.9 d	4.3 b	3.1 cd	2.1 e	2.8 d	3.7 c	0.2	***
Colesterol, mg/dl	114.6 d	179.4 b	247.7 a	138.2 c	124.1 c	107.2 cd	262.7 a	212.0 b	6.0	***
Variables hematológicas										
Hemoglobina, g/dl	8.5 c	8.1 c	7.6 c	10.5 b	12. a	8.9 c	8.0 c	7.8 c	0.3	***
Hematocrito, %	26.4 c	29.4 b	28.4 b	30.3 b	25.1 c	30.7 b	32.3 a	25.3 c	0.7	***
MCHC, g/dl	32. 2 bc	27.6 d	27.0 d	34.5 b	49.7 a	29.4 d	25.2 d	31.1 c	0.9	***
Edad - días	Peso vivo - g									
7	109	106	106	106	105	122	113	118	4	NS
14	352	253	351	334	336	347	342	337	11	NS
21	561	606	596	581	588	605	631	622	18	NS

* MM: multimodular; EGM: glucomananos esterificados; HSCAS: aluminosilicato de calcio y sodio hidratados CME: Cuadrado medio del error MCHC
 Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media En las filas, números con letras distintas difieren con $P < 0.05$ NS, no significativo; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;
 *** $P < 0.001$

En referencia a las variables hematológicas los animales que consumieron la ración que incluía MM y EGM presentaron igual concentración de Hb, y mayor ($P < 0.02$) Hto, lo cual resultó en una menor ($P < 0.001$) MCHC con respecto a los animales control. Los pollos que consumieron la ración con HSCAS mostraron mayor ($P < 0,001$), Hb y Hto y similar MCHC.

En el experimento 2, la inclusión de AAM en las raciones generó menores ($P < 0.001$) niveles de LDH en suero, excepto al incluir HSCAS.

En el suero de los animales que consumían las raciones con MM se observó una respuesta similar a la detectada en el experimento 1, registrándose mayores ($P < 0.001$) valores de proteínas totales y albúmina, menor ($P < 0.001$) de ácido úrico pero similares valores de colesterol en los animales tratamiento que los del grupo control.

En los animales que consumieron alimento que incluía EGM presentaron concentraciones séricas de proteínas totales, albúmina y ácido úrico similares que los del grupo control pero mayor ($P < 0.001$) colesterol. En contraposición, los pollos que consumieron la ración con HSCAS, si bien presentaron similares valores de albúmina y ácido úrico que el grupo control, mostraron menores ($P = 0.03$) valores de proteínas totales y mayor ($P < 0.001$) colesterol.

Con respecto a los valores de hematología, la inclusión de los tres AAM resultaron en valores menores de Hb ($P < 0,001$) y MCHC que la dieta control presentando MM y EGM mayores niveles ($P < 0,001$) en el hematocrito, mientras que con el agregado de HSCAS esta variable no presentó variaciones con respecto al control.

En los dos experimentos, en ninguna de las fechas se registraron diferencias entre los tratamientos en el peso de las aves.

6. DISCUSION

Para todas las variables séricas y hematológicas, la interacción observada entre la ración (combinación de micotoxinas) y el AAM evaluado, indicaría que la respuesta a la adición de cada AAM dependería de la combinación de micotoxinas presente en la ración.

Los niveles de micotoxinas presentes en las dos raciones evaluadas en este trabajo estuvieron por debajo de los valores máximos admisibles por la normativa internacional y nacional (FAO, 2003; MERCOSUR, 2002) y de los valores indicados como tóxicos para los parrilleros de 0 a 3 semanas (Watts *et al.*, 2003). Sin embargo, los niveles de toxinas en las raciones evaluadas fueron superiores a los sugeridos (Mallmann 2008, 2009) como máximos, para las líneas actuales de parrilleros de alta performance en la fase de iniciación. La ración del experimento 1 contenía aflatoxinas y un

nivel de fumonisinas elevado (4.5 ppm) y en la ración del experimento 2, se detectaron contenidos de DON (500ppb) y fumonisinas (1.2 ppm) superiores a los sugeridos.

En los dos experimentos, los menores niveles de LDH en los animales que habían consumido dietas con AMM, estarían indicando que estos aditivos podrían haber evitado o disminuido el daño tisular resultante de la presencia de aflatoxinas, (experimento 1), fumonisinas, (experimentos 1 y 2) y DON (experimento 2). Este daño celular sería resultado de las lisis de las membranas celulares como producto de la peroxidación de las mismas; esa pérdida de integridad celular genera necrosis tisular y liberación de enzimas al medio sanguíneo. En esta situación, el nivel sérico de LDH (grupo de enzimas participantes en la interconversión de piruvato y lactato), es considerado un indicador de esa integridad celular, ya que esta enzima aumenta cuando se produce destrucción tisular por efecto del consumo de dietas contaminadas con aflatoxinas (Skukla *et al.*, 1995, Arrieta *et al.*, 2005), fumonisinas (Brown *et al.*, 1992, Espada *et al.*, 1994, Santin, 2000) y DON (Kubena *et al.*, 1997).

El efecto dañino de las raciones evaluadas, también estaría evidenciado por los valores de las variables séricas y hematológicas de los pollos consumiendo la dieta control. Estos mostraron diferencias en los niveles de proteínas totales, albúmina, ácido úrico, colesterol, Hto y Hb, con respecto a los valores considerados como normales (Proteínas totales: 3.18 ± 0.42 g/dl; albúmina: 1.59 ± 0.33 g/dl; ácido úrico: 8.49 ± 3.48 mg/dl colesterol total: 143 ± 18 mg/dl, Hto.: 28.9 ± 2.48 %, y Hb.: 9.05 ± 1.1 g/dl; (Sandoval *et al.*, 2004) para esta categoría de aves.

En el grupo control del experimento 1, los niveles promedio de proteínas totales, Hto y Hb fueron cercanos al límite inferior del rango de normalidad, mientras que el colesterol estuvo por debajo del límite inferior. Del mismo modo, en el experimento 2, los valores promedio de proteínas totales y colesterol estuvieron cercanos al límite inferior de normalidad (143 ± 18 mg/dl), y el hto estuvo por debajo de ese límite. (28.9 ± 2.48 %) En ambos experimentos, los rangos de valores observados sugieren que en algunas de las aves que consumieron las dietas control, podría haberse producido anemia, probablemente como resultado de los niveles de micotoxinas presentes en las raciones. Estos resultados son consistentes con reportes (Aravind *et al.*, 2003; Watts *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2001; Huff *et al.*, 1986 Santin *et al.*, 2003; Jaramillo, 2006) que indican que las variables serológicas y hematológicas de los pollos pueden ser deprimidas por el efecto aditivo o sinérgico de la combinación de micotoxinas presentes a bajos niveles individuales.

Las diferencias en las proteínas totales, albúmina y ácido úrico de los animales consumiendo dietas con aditivos con respecto a los animales alimentados con las dietas control, también fueron reportadas en aves consumiendo raciones que incluían HSCAS (Kubena *et al.*, 1990), EGM (Swamy *et al.*, 2002; Chowdhury *et al.*, 2004; Chowdhury & Smith, 2005; Faixová *et al.*, 2007; Girish *et al.*, 2008) y MM (Micheluzzi, 2004). En los

animales consumiendo las raciones con AAM, la mayor concentración de proteínas totales y albúmina, así como el menor ácido úrico en suero, podrían relacionarse a un aumento de la síntesis proteica en el hígado como resultado de la acción protectora de los aditivos. En raciones contaminadas con micotoxinas, las tasas fraccionales de síntesis proteica hepática, se reducen por la acción de las aflatoxinas y DON (Kubena *et al.*, 1990; Watts *et al.*, 2003; Swamy *et al.*, 2002; Mikami *et al.*, 2004; Chowdhury *et al.*, 2004; Faixová *et al.*, 2007a,b; Rotter *et al.*, 1996). La disminución en la síntesis de proteínas en el hígado, es consecuencia de la afinidad de metabolitos de aflatoxinas con regiones específicas del ADN del núcleo de los hepatocitos (Osweiler 1996; Roder 2002) y de la acción inhibitoria directa del DON sobre la fase de iniciación, transcripción y traducción (Osweiler 1996; Swamy *et al.*, 2002; Chowdhury *et al.*, 2005). Esto se evidenciaría en una disminución de proteínas totales en suero que se debe principalmente a la disminución de albúmina, proteína que se sintetiza exclusivamente en el hígado (Kaneko, 1997). Al afectarse negativamente la síntesis proteica, los aminoácidos no empleados podrían usarse como fuente de energía resultando en un aumento de ácido úrico en el plasma (Swamy *et al.*, 2002; Chowdhury & Smith 2004 y 2005; Girish *et al.*, 2008).

La mayor concentración de colesterol sérico en aves, como resultado de la incorporación de AAM en las raciones estudiadas en estos experimentos, también ha sido reportada al evaluar el efecto protector de HSCAS (Huff *et al.*, 1986; Kubena *et al.*, 1990) y EGM (Faixová *et al.*, 2007) en dietas para pollos contaminadas con aflatoxinas y DON, respectivamente. Estos aumentos podrían responder a que se habría levantado la restricción en la síntesis de la enzima hidroximetilglutaril-CoA-Reductasa (HMGCoA) así como a un aumento de la síntesis de lipoproteínas, que son las encargadas de transportarlo en sangre. (Anyanwu *et al.*, 2007).

En los dos experimentos, tanto los grupos control como los tratados, presentan valores de Hto y Hb reportados (Bounous & Stedman, 2000) en la literatura como normales para la especie, (22 a 35% y 7 a 13 g/dl para Hto y Hb, respectivamente) por lo cual, las aves en estudio no habrían presentado cuadros de anemia. Si estos valores se acotan a los sugeridos por Sandoval *et al.*, (2004), en base a la casuística en Venezuela para pollos parrilleros sanos (28.9 ± 2.48 %, y 9.05 g/dl ± 1.1) para Hto y Hb respectivamente en ambos experimentos, las aves que habían consumido las raciones sin AMM presentaron niveles de Hto cercanos al límite inferior del rango considerado como normal.

Lo esperado era que los pollos consumiendo las raciones con AMM, presentaran mayor concentración de Hb y Hto que los que consumieron la ración control, ya que las aflatoxinas y el DON pueden afectar la síntesis de transferrina en el hígado y la elongación y transcripción de la síntesis proteica en los eritrocitos. Así mismo, estas toxinas, así como las fumonisinas, producen alteraciones de las membranas de los glóbulos rojos y estrés oxidativo que derivan en modificaciones celulares (Surai & Dvorska, 2005), esto podría explicar la disminución del Hto por la acción de estas toxinas, sin embargo esa respuesta no se observó.

Al evaluar el efecto de la adición de AMM en los niveles de Hto y Hb, no se evidenció la misma respuesta de las dos variables con respecto a los valores encontrados en los animales consumiendo la dieta sin aditivos. Así en el experimento 1, los valores de Hb al emplear MM no se diferenciaron del tratamiento control, mientras el Hto presentó valores mayores.

En ambos experimentos se registraron respuestas más aproximadas a lo esperado, en el Hto que en la Hb. Esto pudo responder a combinaciones y niveles de las micotoxinas afectando en forma diferente los procesos relacionados a la síntesis de Hb y la producción de eritrocitos. Resultados similares fueron reportados por Dänicke *et al.*, (2003) en pollos parrilleros al incorporar MM en raciones naturalmente contaminadas con micotoxinas de *Fusarium*. No se encontró explicación a las menores concentraciones de Hb observadas en el experimento 2 al incluir AMM.

Los pesos de los pollos fueron normales para la categoría utilizada, no constatándose diferencias entre los distintos tratamientos a lo que pudo contribuir el corto tiempo de experimentación, pareciendo que las posibles mejoras metabólicas registradas no se manifestaran en el comportamiento animal. Sin embargo, el posible efecto “protector” de las AMM a nivel metabólico podría manifestarse en mejoras de las variables productivas cuando las aves fueran sometidas a una situación de estrés ambiental. La ausencia de respuesta productiva al uso de AMM concuerda con experiencias de Swamy *et al.*, (2002, 2004) quienes evaluaron dietas naturalmente contaminadas con micotoxinas de *Fusarium* (DON, Zearalenona, ácido fusárico y 15 acetyl deoxinivalenol) suplementadas con EGM y no encontraron diferencias con respecto al grupo control (sin EGM) al cabo de 21 días.

Las diferencias observadas en las variables estudiadas entre los animales alimentados con las dietas naturalmente contaminadas y aquellas con AMM, muestran una concordancia razonable con los resultados reportados por Swamy *et al.*, (2002); Chowdhury *et al.*, (2004); Girish *et al.*, (2008a) cuando las raciones incluían EGM.

En el Experimento 1, la efectividad de los tres AAM en modificar positivamente las variables séricas y algunas hematológicas, podría deberse a la presencia simultánea de aflatoxinas y fumonisinas, ya que existen reportes de la efectiva acción detoxificante de estos aditivos al incluirse en dietas contaminadas con aflatoxinas (Pimpukdee *et al.*, 2004; Arrieta *et al.*, 2006b) o fumonisinas (Starkl 2008).

En el Experimento 2, el nivel de zearalenona presente en las raciones no alterarían las variables estudiadas en este trabajo, ya que los efectos negativos de esta toxina se asocian a variables reproductivas (Riley & Pestka, 2005). Adicionalmente, existen antecedentes que indican que las aves son relativamente resistentes a su acción (Hollinger & Ekperigin, 1999; Danicke *et al.*, 2002).

En este experimento, la mayor efectividad detoxificante de MM en la mayoría de las variables estudiadas, podría estar relacionada a la presencia en la ración de DON (en concentraciones por encima de las máximas recomendadas) y fumonisinas. La acción detoxificante sobre el DON estaría relacionada a su capacidad para desdoblar el anillo epoxi característico de los trichotecenos por poseer en su formulación la enzima epoxidasa (Díaz *et al.*, 2002, 2005).

7. CONCLUSIONES

La inclusión de AMM modificó favorablemente algunos de los valores séricos y hematológicos de pollos parrilleros que consumieron raciones naturalmente contaminadas con combinaciones subtóxicas de micotoxinas. Las respuestas variaron dependiendo del AAM incluido y la combinación de micotoxinas presente en la ración.

En el experimento 1, los tres AMM evaluados aparecerían como promisorios para modificar positivamente las variables serológicas y hematológicas monitoreadas en pollos parrilleros de iniciación de 21 días de edad que consumían una ración naturalmente contaminada con 4,6 ppb de aflatoxina B₁, 1,1 ppb de aflatoxina B₂ y 4,5 ppm de fumonisina. En el experimento 2, MM aparentó ser el más efectivo para mejorar el mayor número de las variables evaluadas en aves que consumían otra ración naturalmente contaminada con 500 ppb de DON, 1,2 ppm de fumonisina y 500 ppb de zearalenona

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Abo-Norag M.** (1995). Influence of a hydrated sodium calcium aluminosilicate and virginiamycin on aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* 74:626-632
2. **AOAC.** (1995). Sections 975.35, 976.22 in *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg MD 15th ed. Edited by K. Helrich (Gaithersburg: AOAC International)
3. **AOAC.** (2005). Sections 970.45 in *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, (Gaithersburg: AOAC International)
4. **Anyanwu J., Ehiri J. and Kanu I.** (2007). High Cholesterol Levels and Chronic Exposure to Toxigenic Molds in Damp Buildings: A High Risk for Cardiovascular Diseases and Stroke. *The Internet J. Toxicol.* Disponible en: <http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijto/vol3n2/c/cholesterol.xml> Fecha de consulta:16/08/2009
5. **Aravind K., Patil V., Devegowda G., Umakantha B. and Gampole S.** (2003). Efficacy of modified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance, serum, biochemical and hematological parameters in broilers. *Poult. Sci* 82:571-576.
6. **Arrieta D., Pérez M., Gómez C., Molero G., Novoa E., Rincón H. y Ascanio E.** (2006a). Efecto del alimento contaminado con aflatoxina B₁ sobre la morfología hepática y actividad enzimática sérica en pollos de engorde. *FCV-LUZ*16:39-47
7. **Arrieta D., Pérez M., Gómez C., Ascanio E., Irausquin B. y Molero G.** (2006b). Efecto del consumo de cultivo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y/o selenio en pollos de engorde expuestos a bajos niveles de aflatoxina B₁ en la dieta. *FCV-LUZ* 6:613-624
8. **Arrieta D., Pérez M., Luengo A., Hernández J., Lista D. and Mosquera J.** (2007). Alteraciones histológicas hepáticas e incremento de proteínas séricas en pollos de engorde alimentados con dietas suplementarias con *Saccharomyces cerevisiae*. *Invest. Clin.* 48:431-443. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0535-51332007000400004&script=sci_arttext Fecha de consulta: 05/09/2009
9. **Awad W., Bohm J., Razzazi E., Hulan H. and Zentek J.** (2004). Effects of deoxynivalenol on electrical properties of intestinal mucosa of laying hens *Poult. Sci.*83:1964-1972

10. **Awad W., Bohm J., Razzazi E, and Zentek J.** (2005a). In vitro effects of deoxynivalenol and l-prolineon electrophysiological parameters in the jejunum of laying hens. *Poult.Sci.*84:928-932
11. **Awad W., Bohm, J., Razzazi F. - Fazeli E., and Zentek J.** (2006a). Effect of adition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villa of broiler chickens. *Poult. Sci.* 85:974-979
12. **Awad W., Aschenbach J., Setyabudi F., Razzazi F. - Fazeli E., Bohm J., and Zentek J.** (2007). In vitro effects of Deoxynivalenol on small intestinal d-glucosa uptake and absorption of Deoxynivalenol across the isolated jejunal epithelium of laying hens. *Poult. Sci.* 86:15-20
13. **Bailey R., Kubena L., Harvey R., Buckley S. and Rottinghaus G.** (1998). Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T2 toxin in broiler chickens. *Poult. Sci.* 77:1623-1630
14. **Ballesteros F. & Ramón F.** (2000). Intoxicaciones por productos alimentarios. En: Mencías Rodríguez E. & Mayero Franco L. *Manual de Toxicología Básica.* Ed. Díaz de Santos. Madrid. Cap. 5, pp183-230
15. **Basmacioglu H., Oguz H., Ergul M., Col R. and Birdane Y.** (2005) Effect of dietary esterified clucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. *Czech. J. Anim. Sci.*50:31-39 Disponible al 25/2/2010 en : <http://www.cazv.cz/attachments/5-Basmacioglu.pdf>
16. **Bhat R. & Vasanthi S.** (1999). Mycotoxin contamination of foods and feeds. Working document of the Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins. MYC-CONF/99/4a. 3-6 March Tunis, Tunisia. Disponible en: <http://venetoagricoltura.regione.veneto.it/archive/00000036/01/myco4a.pdf> Fecha de consulta: 06/08/2009
17. **Binder E.** (2000). New decontamination techniques. En: *Atualidades en micotoxinas e armazenagem de graos.* Ed. Scussel, Florianópolis. Cap. 8, pp. 186-194
18. **Blood D. & Radostitis O.** (1992). Intoxicación por especies de *Aspergillus*. En: *Medicina Veterinaria.* Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana de España, 7ª ed., Cap. pp 1416-1417.
19. **Bounus D. & Stedman L.** (2000). Normal avian hematology chicken and turkey. En: *Schalm`s Veterinary Hematology.* Feldman B., Zinki J., Jain N. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 5a ed. Philadelphia. Cap. pp 1147 1154.

20. **Bradley G., Savage T. and Timm, K.** (1993). The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on male poult performance and ileal morphology. *Poult. Sci.* 73:1766-1770.
21. **Brenes A., Smith M., Guenter W. and Marquardt R.** (1993). Effect of enzyme supplementation on the performance and digestive tract size of broiler chickens fed wheat and barley based diets. *Poult. Sci.* 72:1731-1739
22. **Broomhead J., Ledoux D., Bermudez A. and Rottinghaus G.** (2002). Chronic effects of fumonisin B₁ in broilers and turkeys fed dietary treatments to market age. *Poult. Sci.* 81:56-61
23. **Brown T., Rottinghaus G. and Williams M.** (1992). Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Performance and pathology. *Avian Dis.* 36:450-454
24. **Bursian S., Aulerich R., Cameron J., Ames N. and Steficek B.** (1992). Efficacy of hidrayed sodium calcium aluminosilicate in reducing the toxicity of zearalenone to mink *J.Appl.Toxicol.* 12:85-90
25. **Caemán A. & Repetto M.** (1995). Estado actual de la Toxicología alimentaria. En: Repetto M. *Toxicología avanzada*. Ed. Díaz de los Santos, Madrid, Cap 7. pp 242-292
26. **Campos P. & Malaquido A.** (2003). Micotoxinas en rumiantes. XXXI Jornadas de Buiatría 12-13, Junio, Paysandú, Uruguay, pp1-5
27. **Castenaro M. & Mc Gregor D.** (1998). Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Revue de Medecine Veterinaire, France* 149: 671- 678
28. **Castiglioni E., Fernandes C., Sirchiroli A., Cardoso P., Ledoux D., and Rottinghaus G.** (2006). Parámetros hematológicos de frangos de corte alimentados con ração contendo aflatoxina B₁ e fumonisina B₁ *Ciencia Rural* 36:924-929
29. **Celik I., Oguz H., Demet O., Donmez H. and Boidak M.** (2000). Efficacy of Polivinylpirrolidone (PVPP, Mycofix Plus) in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. *Br. Poult. Sci.* 41:430-439
30. **Coulombe R.** (1993). Symposium: Biological action of mycotoxins *J. Dairy. Sci.* 76:880-889
31. **Chi M., Mirocha H., Kuntz H., Weaver G., Bates F., Robison T. and Shimoda W.** (1980). Effects of dietary zearalenone on growing broiler chicks. *Poult. Sci.* 59:531-536

32. **Chowdhury S. & Smith T.** (2004). Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* micotoxins on performance and metabolism of laying hens. *Poult. Sci.* 83:1849-1856
33. **Chowdhury S., Smith T., Boermans H., Setton A., Downey R. and Woodward B.** (2005a). Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* micotoxins on performance, metabolism, hematology and immunocompetence of ducklings. *Poult. Sci.* 84:1179-1185
34. **Chowdhury S. & Smith T.** (2005b). Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* micotoxins on hepatic fractional protein synthesis rates of laying hens and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *Poult. Sci.* 84:1671-1674
35. **Chowdhury S., Smith T., Boermans H. and Woodward B.** (2005c). Effects of feed-borne *Fusarium* micotoxins on hematology and immunology of laying hens. *Poult. Sci.* 84:1841-1850.
36. **Chung T., Erdmanand J. and Baker D.** (1990). Hydrated sodium calcium aluminosilicate: effects on zinc, manganese, vitamin A, and riboflavin utilization. *Poult. Sci.* 69:1364-1370
37. **Dalvi R. & Ademoyero A.** (1984). Toxic effects of aflatoxin B₁ in chickens given feed contaminated with *Aspergillus flavus* and reduction of the toxicity by activated charcoal and some chemical agents. *Avian. Dis.* 28:61-69
38. **Dalvi, R & Mc Gowan C.** (1984). Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chickens by purified aflatoxin B₁ and its reversal by activated charcoal, Phenobarbital and reduced glutathione. *Poult. Sci.* 63:485-489
39. **Dänike S., Ueberschär K., Halle I. and Valenta H.** (2002). Effect of addition of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or *Fusarium* toxin-contaminated maize on performance of hens and on carry over of zearalenone. *Poult. Sci.* 81:1671-1680.
40. **Dänicke S., Matthes S., Halle I., Ueberschär K., Doll S. and Valenta H.** (2003). Effects of graded levels of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and of a detoxifying agent in broiler diets on performance, nutrient digestibility and blood chemical parameters. *British Poult. Sci* 44:113–126.
41. **Dänicke S., Valenta H., Doll M., Ganter M. and Flachowsky G.** (2004). On the effectiveness of a detoxifying agent in preventing fusario-toxicosis in fattening pigs. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 114:141-157

42. **Davidson, J., Babish J., Delaney K., Taylor D. and Phillips T.** (1987). Hydrated sodium calcium aluminosilicate decreases bioavailability of aflatoxin in the chicken. *Poult. Sci.* 66 (Suppl. 1):89
43. **Del Bianchi M., Oliveira C., Albuquerque R., Guerra J. and Correa B.** (2005). Effect of prolonged oral administration of Aflatoxina B₁ and Fumonicina B₁ in broiler chickens. *Poult. Sci.* 84:1835-1840
44. **Denli M., Blandon J., Guynot M., Salado S. and Perez J.** (2009). Effects of dietary Afla Detox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B₁. *Poult. Sci.* 88:1444-1541
45. **Desheng Q., Fan I., Yanhu Y. and Niya Z.** (2005). Adsorption of aflatoxin B₁ on montmorillonite. *Poult. Sci.* 84:959-961
46. **Devewogda G., Rajú M., Afzati N. and Swamy H.** (1998). Panorama mundial sobre micotoxinas. Soluciones novedosas para contrarrestarlas. En: 8ª Ronda Latinoamericana de Alltech [S.L.] pp 69-82.
47. **Devegowda G. & Murthy T.** (2005). Mycotoxins: effect on poultry performance and health. En: *The Mycotoxin Blue Book*. Ed. Duarte Díaz, Nottingham University Press, Cap.2, pp 25-56.
48. **Diario Oficial N° 25.467** (Febrero 21 de 2000). 1440-C a 1444-C, carillas N° 64 a 68. Montevideo, Uruguay: Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales.
49. **Diario Oficial N° 27.010** (Junio 8 de 2006). Decreto del Ministerio de Salud Pública N° 155/006. Montevideo, Uruguay: Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales
50. **Díaz G.** (2002). Evaluation of the efficacy of a feed additive to ameliorate the toxic effects of 4 15-Diacetoxiscirpenol in growing chicks *Poult. Sci.* 81:1492-1495
51. **Diaz D. & Smith T.** (2005). Mycotoxins sequestering agents. Practical tools for the neutralization of micotoxins. En: *The Mycotoxin Blue Book*. Ed. Duarte Díaz, Nottingham University Press. Cap. 15 pp 323-339.
52. **Diaz G., Cortés A. and Roldán L.** (2005). Evaluation of the efficacy of four feed additives against the adverse effects of T-2Toxin in growing chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 14:226-231
53. **Díaz G.** (2007). Actualización sobre micotoxinas. *Avic. Prof.* 25:28-31

54. **Diekman M. & Green M.** (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.* 70:1615-1627.
55. **Doumas B. and Peters T.** (1995). Serum and urine albumin. A progress report of their measurement and clinical significance en Johnson A., Rohfls E., Silverman L. (1999) en *Proteins en Titez* Textbook of Clinical Chemistry. Ed Saunders-Company, 3^a Ed, Philadelphia. Cap 20, pp. 477-540.
56. **Dvorska J. and Surai P.** (2001). Effect of T-2 toxin, zeolite and Mycosorb on antioxidant system on growing quail. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14:1752-1757. Abstract disponible en: http://d.wanfangdata.com.cn/NSTLQK_NSTL_QK5508543.aspx Fecha de consulta: 01/10/2009
57. **Dvorska J., Pappas A., Karadas F., Speake B. and Surai P.** (2007). Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. Abstract disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6W89-4N1T1SX&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_searchStrId=1057767214&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=8c2c083d7e9f7e6500e8608dff4c237 Fecha de consulta: 01/10/2009
58. **Dwyer M., Kubena L., Harvey R., Mayura K., Sarr A., Buckley S., Bailey R. and Phillips T.** (1997). Effects of inorganic adsorbents and ciclopiazonic acid in broiler chickens. *Poult. Sci.* 76:1141-1149
59. **Edrington T., Kubena L., Harvey R. and Rottinghaus G.** (1997). Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T2 toxin in growing broilers. *Poult. Sci.* 76:1205-1211
60. **El Nezami H., Mykkanen H., Kankaanpaa P., Salminen S. and Ahokas J.** (2000). Ability of Lactobacillus and Propioni bacterium strains to remove aflatoxin B₁ from the chicken duodenum. *J. Food Prot.* 63:549-552
61. **Espada, Y., Ruiz de Gopegui R., Cuadradas C. and Cabanes F.** (1994). Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. *Avian Dis.* 38:454-460.
62. **Faixová Z., Faix S., Borutová R. and Leng R.** (2007a). Comparison of two methods to counteract the effects of the deoxynivalenol. *Folia Vet.* 51:34-37.
63. **Faixová Z., Faix S., Borutová R. and Leng R.** (2007b). Effect of different doses of deoxynivalenol on metabolism in broiler chickens.

64. **Fernandes C., Burkeraitis P., Ledoux D. y Rottinghaus G.** (2007). Efeito de ingestão de fumonocina B₁ no peso corporal e na histopatologia de codornas japonesas. (*Coturnix coturnix japonica*). *Ciencia Rural* 37:284-287.
65. **Fernandez A., Verde M., Gascon M., Ramos J., Gomez J., Luco D. and Chavez G.** (1994). Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin-containing feed. *Avian Pathol.* 23:37-47
66. **Fernández A., Verde M., Gómez J., Gascon M. and Ramos J.** (1995). Changes in the prothrombin time, hematology and serum proteins during experimental aflatoxicosis in hens and broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 58:119-122
67. **García R., Avila E., Rosiles R. and Petrone V.** (2003). Evaluation of two mycotoxin binders to reduce toxicity of broiler diets containing ochratoxin A and T-2 toxin contaminated grain. *Avian Dis.* (47) 691-699.
68. **Gargees M. and Shareef A.** (2008). Mycofix ameliorative effect on Newcastle disease antibody production in broiler chickens during aflatoxicosis. *Iraqi J. Vet. Sci.* 22:29-34. Disponível em: <http://www.vetmedmosul.org/ijvs/media/e7.pdf> Fecha de consulta: 20/09/2009
69. **Girish C., Smith T., Boermans H. and Karrow N.** (2008a). Effects of feeding blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* micotoxins on performance, hematology, metabolism and immunocompetence of turkeys. *Poult. Sci.* 87:421-432
70. **Girish C. and Smith T.** (2008b). Effects of feeding blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* micotoxins on small intestinal morphology of turkeys *Poult.Sci* 87:1075-1082
71. **Girish C., Mac Donald E., Scheinin M. and Smith T.** (2008c). Effect of feedborne *Fusarium* micotoxins on brain regional neurochemistry of turkeys. *Poult. Sci.* 87:1295-1302
72. **González S. and Heus L.** (2000). Intoxicacion alimentaria. En *Patología Toxicológica* 3^a ed. Ed. Oficina del Libro FEFMUR, Montevideo, Uruguay. Cap. 17 315-338
73. **71. Guaiame E.** (2005). Master of Science Effects of continuous administration of low-dose of *Escherichia coli* lipopolysaccharide in

chicks and poult fed non toxic doses of aflatoxin B₁ and T-2 toxin. Faculty of the Graduate School University of Missouri-Columbia. United States of America. Disponible en: <http://edt.missouri.edu/Summer2005/Thesis/GuaiumeE-072705-T3028/research.pdf> Fecha de consulta: 14/08/2009

74. **Hanif N., Muhammad G., Siddique M., Khanum A., Ahmed T., Gadahai J. and Kaukab G.** (2008). Clinico-pathomorphological, serum biochemical and histological studies in broilers fed ochratoxin A and a toxin deactivator (Mycofix® Plus). Br Poult. Sci. 49:632-642 Disponible 05/10/2009 en: [http://www.labmeeting.com/paper/28325169/hanif-2008-clinico-pathomorphological-serum-biochemical-and-histological-studies-in-broilers-fed-ochratoxin-a-and-a-toxin-deactivator-\(mycofix\(r\)-plus\)](http://www.labmeeting.com/paper/28325169/hanif-2008-clinico-pathomorphological-serum-biochemical-and-histological-studies-in-broilers-fed-ochratoxin-a-and-a-toxin-deactivator-(mycofix(r)-plus))
75. **Harvey R., Kubena L., Philips T., Huff W. and Corrier D.** (1989). Prevention of aflatoxicosis by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to the diets of growing barrows. Am. J. Vet. Res. 50:416-420
76. **Harvey R., Kubena L., Philips T., Corrier D., Elissalde M. and Huff W.** (1991a). Diminution of aflatoxin toxicity to growing lamb by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. Am. J. Vet. Res. 52:152-156.
77. **Harvey R., Philips T., Ellis J., Kubena L., Huff W. and Petersen H.** (1991b). Effects on aflatoxin M₁ residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diet of dairy cows. Am. J. Vet. Res. 52:1556-1559
78. **Henry M. and Wyatt R.** (2001). The toxicity of fumonisin B₁, B₂ and B₃, individually and in combination, in chicken embryos. Poult. Sci. 80:401-407.
79. **Hollinger K. and Ekperigin E.** (1999). Mycotoxicosis in food producing animals. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 15:133-164.
80. **Horea S.** (2005). Evaluation of the effect of Mycofix® select in practical diets contaminated with deoxynivalenol and ochratoxin A. Biomin Trials Disponible en: http://www.mycofix.biomin.net/TrialPDFs/Mycofix%20Select_Broiler_Romania2005.pdf Fecha de consulta: 5/10/09
81. **Huff W., Kubena L., Harvey R., Corrier D. and Mollenhauer H.** (1986). Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. Poult. Sci. 65:1891-1899.

82. **Huff W., Kubena L., Harvey R. and Phillips D.** (1992). Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin. *Poult. Sci.* 71:64-69
83. **Hulan H. and Proudfoot F.** (1982). Effects of feeding vomitoxin contaminated wheat on the performance of broiler chickens. *Poult. Sci.* 61:1653-1659
84. **Humphreys D.** (1990). Micotoxinas en Toxicología Veterinaria. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill, 3ª ed., Madrid, Cap.12. pp 293-323
85. **Huwing A., Freimund S., Käppeli O. and Dutler H.** (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology letters* 122:179-188
86. **Hussein H. and Brasel J.** (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology* 167:101-134.
87. **IFCC** (1994). Method for L. D. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32639 citado por Moss & Henderson (1999) *Clinical Enzimology* en Burtis C and Ashwood E. en Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Ed Saunders-Company, 3ª Ed, Philadelphia, Cap 22, pp 617-721.
88. **Investigación Aplicada S.A.** (1996). Micotoxinas y producción pecuaria. Manual de referencia. IASA. 2ª ed. Puebla, México
89. **Jacobson W. and Wierman H.** (1974). Transmission of aflatoxin B₁ into eggs. *Poult. Sci.* 53:1743-1745
90. **Janaczyk B., Pliszcak-Król A., Graczyk S., Houszka M. and Rouibah K.** (2006). Morphological and functional evaluation of chicken blood leukocytes in chronic ochratoxicosis. *Int. J. Poult. Sci.* 5:191-194 Disponible en: <http://www.pjbs.org/ijps/fin297.pdf> Fecha de consulta: 20/05/2009
91. **Javed T., Dombrink-Kutzman M., Richard J., Bennet L., Cote M. and Buck W.** (1995) Serohematological alterations in broiler chicks on feed amended with fusarium proliferatum culture material or fumonisin B₁ and moniliformin. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:520-526
92. **Jurado Couto R.** (1989). Micotoxinas cancerígenas, micotoxinas gastroenterotóxicas y micotoxinas estrogénicas. En: *Toxicología Veterinaria*. Ed. Salvat. 2ª ed. Barcelona. Cap 46. pp. 489-497
93. **Kahn C.** (2007). Manual Merck de veterinaria. 6ª ed. N.J. USA. Ed. Océano Centrum, Merial. 2682 p

94. **Kececi T., Kurtuglu H. and Demet D.** (1998). Effects of polyvinylnopolypyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broilers chickens during aflatoxicosis. *Br. Poult. Sci.* 39:452-458
95. **Kiran M., Demet O., Ortatatli M. and Oguz H.** (1998). The preventive effect of polyvinylpolypyrrolidone on aflatoxicosis in broilers. *Avian Path.* 27:250-255.
96. **Klaassenn C. and Watkins J.** (2000). Toxicología de los alimentos. En: Manual de Toxicología Ed. Mc Graw-Hill Interamericana 5ª ed. México D.F. Cap. 29 pp 859-899
97. **Korosteleva N., Smith T. and Boermans H.** (2007). Effects of feedborne *Fusarium* mycotoxins on the performance, metabolism, and immunity of dairy cows *J. Dairy Sci.* 90:3867-3873
98. **Kubena L., Swanson S., Harvey R., Fletcher O., Rowe L. and Phillips T.** (1985). Effects of feeding deoxynivalenol (Vomitoxin) contaminated wheat to growing chicks. *Poult. Sci.* 64:1649-1655
99. **Kubena L., Harvey R., Huff W., Corrier D., Phillips T. and Rottinghaus G.** (1990a). Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T2 toxicity. *Poult. Sci.* 69:1078-1086
100. **Kubena L., Harvey R., Phillips T., Corrier D. and Huff W.** (1990b). Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poult. Sci.* 69:727-735
101. **Kubena L., Huff W., Harvey R., Yersin A., Elissalde M., Witzel D., Giroir L., Phillips T. and Pettersen H.** (1991). Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on growing turkey poults during aflatoxicosis. *Poult. Sci.* 70:1823-1830
102. **Kubena L., Harvey R., Huff W., Elissalde M., Yersin A., Phillips T. and Rottinghaus G.** (1993a). Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol *Poult. Sci.* 72:51-59
103. **Kubena L. and Harvey R.** (1993b). Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate on aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* 72:651-657
104. **Kubena L., Edrington T., Kamps-Holitzapple, Harvey R., Elissalde M. and Rottinghaus G.** (1995). Effects of feeding fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and aflatoxin singly and in combination to turkeys poults. *Poult. Sci.* 74:1295-1303

105. **Kubena L., Edrington T., Harvey R., Bucley S., Phillips T., Rottinghaus E. and Caspers H.** (1997). Individual and combined effects of Fumonisin B₁ present in Fusarium moniliforme culture material and T2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. *Poult. Sci.* 76:1239-1247.
106. **Kubena L., Harvey R., Bayley R., Buckley S. and Rottinghaus E.** (1998). Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T. Bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poult. Sci.* 77:1502-1509
107. **Kumar R. and Balachandran Ch.** (2009). Histopathological changes in broiler chickens fed aflatoxin and cyclopiazonic acid. *Vet. Archiv.* 79:31-40
108. **Landeros P., ReyesW., de Lucas E., Albarrán E., López Y. and Quezada T.** (2008). Evaluación de dos adsorbentes (manano oligosacáridos y clinoptilolita) en dietas de pollos de engorde contaminadas con Fumonisin B₁. *Rev. Salud Anim.* 30:50-58
Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ras/v30n1/ras08108.pdf> Fecha de consulta: 10/09/2009
109. **Ledoux D., Brown T., Weibking T. and Rottinghaus G.** (1992). Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:330–333.
110. **Ledoux D., Rottinghaus G., Bermúdez A. and 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
111. **Lindermann M., Blodgett D., Kornegay E. and Schurig G.** (1993). Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling growing swine. *J. Anim. Sci.* 71:171-178
112. **Locksley Trenholm L.** (2000). Binding Agents: to reduce the toxicity of mycotoxins in feed. En: *Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos.* Ed Scussel. Florianópolis. Cap. 8 pp 177-185
113. **Lumeij J.** (1997). Avian clinical biochemistry. En: Kaneko J., Harvey J. and Bruss M. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 5^a ed. London Academic Press. pp. 857-883
114. **Mabbett T.** (2004). Manejo de las micotoxinas en las aves. *Ind. Avíc.* 51:22-27.
115. **Mallmann C., Dilkin P., Zanini L., Hummes R. and Emmanuelli C.** (2008). Micotoxinas para ingredientes en alimento balanceado de aves. *Ind. Avíc* 55:14-18.

116. **Mallmann C., Dilkin P., Zanini L., Hummes R. and Emmanuelli C.** (2009). Micotoxinas en ingredientes para alimento balanceado de aves. Factores que interfieren en la producción de micotoxinas. *Avic. Prof.* 27:18-21
117. **Maurice D., Bodine A., and Rehner N.** (1983). Metabolic effects of low aflatoxin B₁ levels on broiler chicks. *Applied and environmental microbiology.* 45:980-984 Disponible en: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/45/3/980> Fecha de consulta: 16/09/2009
118. **Martínez A.** (2000). Método de amoniación para raciones contaminadas por aflatoxinas y fumonisinas. En: Scussel. *Atualidades en micotoxinas e armazenagem de grãos.* Florianópolis. Cap. 8 pp202-208
119. **Meireles M. y Riet F.** (1991). Introdução ao estudo das micotoxicoses En *Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos.* Ed. Hemisferio Sur. Montevideo; Pelotas. Cap. 2 pp.21-41
120. **Mc Kenzie K., Kubena L., Denvir A., Rogers T., Hitchens G., Bailey R., Harvey R., Buckley S. and Phillips T.** (1998). Aflatoxicosis in turkey poult is prevented by treatment of naturally - contaminated corn with ozone generated by electrolysis. *Poult. Sci.* 77:1094-1102
121. **Mezes M., Barta M. and Nagy G.** (1999). Comparative investigation on the effect of T-2 mycotoxin on lipid peroxidation and antioxidant status in different poultry species. *Res. Vet. Sci.* 66:19-23
122. **Miazzo R., Rosa C., Carvalho E., Magnoli C., Chiacchiera M., Palacio G., Saénz M., Kikot A., Basaldella E. and Dalcero A.** (2000). Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poult. Sci.* 79:1-6.
123. **Miazzo R., Peralta M., Magnoli C., Salvano M., Ferrero S., Chiacchiera S., Carvalho E., Rosa C. and Dalcero A.** (2005). Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poult. Sci.* 84:1-8
124. **Micheluzzi L.** (2004). Effects of Mycofix® Plus in diets contaminated with aflatoxin, T-2 toxin and ochratoxin on broiler. *Biomin Trials.* Disponible en: <http://www.mycofix.biomin.net/TrialPDFs/Mycofix%20Plus%20Broiler%20Argentinien2004.pdf> Fecha de consulta: 01/09/09
125. **Midio A. y Martins D.** (2000). Agentes tóxicos contaminantes directos de alimentos. En: *Toxicología de alimentos.* Ed. Varela e Livraria Ltda. São Paulo, Brasil. Cap. 3 pp.61-159

126. **Mikami O., Yamamoto S., Yamanaka N. and Nakajima Y.** (2004). Porcine hepatocytes apoptosis and reduction of albumin secretion induced by deoxynivalenol. *Toxicol*, 15, 241-249. Abstract disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCN-4D4VHW0&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_searchStrId=1054917574&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=53298788db5f19a57f0545e127d1dd00 Fecha de consulta: 18/10/09
127. **Morales R.** (2007). Las paredes celulares de Levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde. Tesis doctoral Universitat Autònoma de Barcelona, España. Disponible en: http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0124108-134256/rml1de1.pdf Fecha de consulta: 15/08/09
128. **Morán E., Hunter B., Fernet L., Young G. and Migar G.** (1982). High tolerance of broilers to vomitoxin from corn infected with *Fusarium graminearum*. *Poult. Sci.* 61:1828-1831
129. **Morante G.** (2006). Manejo del riesgo en la preservación de la calidad de los granos. *Avic. Prof.* 24:24-26.
130. **Morbini J., Ruiz F. y Mallmann C.** (2006). Adição de bentonita sódica como adsorbente de aflatoxinas em rações de frangos de corte. *Ciencia Rural.* 36:1594-1599
131. **Mycofix Plus 3.0®** [S.D.] Un sistema modular para inactivar micotoxinas. Bio min [S.L.]
132. **Newman D. and Price C.** (1999). Renal function and nitrogen metabolites en Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Ed Saunders-Company, 3ª Ed, Philadelphia. Cap 35, pp.1204 - 1270
133. **Oliver M.** (1989). Sodium bentonite as a component in layer diets. *Br Poult. Sci.* 30:841-846
134. **Osborne D. and Hamilton P.** (1981). Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. *Poult. Sci.* 60:1818-1820
135. **Osweiler G.** (1996). Mycotoxins En: Osweiler G. Toxicology Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. Cap. 29, pp. 409-432.
136. **Osweiler G.** (2000). Contemporary issues of food animal health and productivity. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 16:511-531
137. **Perozo F., Ferrer J., Alvarado M., Rincón H., Mavarez Y. and Gil M.** (2003a). Valores hematológicos en pollos de engorde expuestos de

forma continua a bajas dosis de aflatoxina B₁ en el estado de Zulia, Venezuela. FCV-LUZ 13:59-64

138. **Perozo F., Rivera S., Finol G. and Mavárez Y.** (2003b). Aflatoxina B₁, selenio y *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta inmune de pollos de engorde en el estado de Zulia, Venezuela. FCV-LUZ 13:360-370
139. **Perusia O. and Rodríguez R.** (1997). Plantas tóxicas y micotoxinas. Cuaderno de divulgación técnica N° 4, 3ª ed. Esperanza. Círculo de Médicos Veterinarios, 119p.
140. **Phillips T., Kubena L., Harvey R., Taylor D. and Heidelbaugh N.** (1988). Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poult. Sci.* 67:243-247
141. **Phillips T., Clement B., Kubena L. and Harvey R.** (1990). Detection and detoxification of aflatoxins prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Vet. Hum. Toxicol.* 32:15-19
142. **Pier A.** (1992). Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *J. Anim. Sci.* 70:3964-3967
143. **Pimpukdee K., Kubena L., Bailey C., Huebner H. and Phillips T.** (2004). Aflatoxin induced toxicity and depletion of hepatic vitamin A in young broiler chicks: protection of chicks in the presence of low levels of Novasil PLUS® in the diet. *Poult. Sci.* 83:737-734
144. **Price W., Lovell R. and Mc Chesney D.** (1993). Naturally occurring toxins in feedstuffs: Center for Veterinary Medicine Perspective. *J. Anim. Sci.* 71:2556-2562
145. **Raju M. and Davegowda G.** (2000). Influence of modified glucomannanos performance and organ morphology, serum biochemistry and hematology in broilers expomed to individual and combined mycotoxicosis. *Br. Poult. Sci.*41:640-650
146. **Ramos A., Fink-Gremmels and Hernández E.** (1996). Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of non nutritive adsorbent compounds. *J. Food Prot.* 59:631-641
147. **Raymond S., Smith T., and Swamy H.** (2003). Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.* 81:2123–2130

148. **Repetto M.** (1997). Procesos fisiopatológicos de origen tóxico. En: Toxicología Fundamental 3ª ed. Ed. Díaz de los Santos Madrid. Cap. 7 pp 163-244
149. **Repetto M.** (1995). Toxicología Avanzada Ed. Díaz de los Santos Madrid. 621p.
150. **Rifal N., Bachorik P. and Albers J.** (1999). Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins en Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Ed Saunders-Company, 3ª Ed, Philadelphia Cap. 25, pp 809-861.
151. **Riley R. and Pestka J.** (2005). Mycotoxins: metabolism, mechanisms and biochemical markers in interactions. En: Diaz D. The Mycotoxin blue book. Ed. Nottingham University Press. Nottingham. Cap.13 pp279-294
152. **Rivero R., Feed O. and Lafluf O.** (1991). Aflatoxicose. En: Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo; Pelotas. Cap. 3 pp102-106
153. **Roder J.** (2002). Listado alfabético de las toxinas más habituales en Veterinaria. En: Roder Manual de Toxicología Veterinaria. Ed. Multimédica. Barcelona. Cap. 4 pp 63-275
154. **Rosa C., Miazzo R., Magnoli C., Salvano M., Chiachiera S., Ferrero S., Saenz M., Carvalho E. and Dalcero A.** (2001). Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. Poultry Sci. 80:139-144
155. **Rotter B., Prelusky D. and Pestka J.** (1996). Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin). J. Toxicol. Environ. Health. 48:1-34
156. **Sammarajeeva V., Sen A., Cohen M. and Wey C.** (1990). Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. J. Food. Prot. 53:489-501
157. **Sandoval G., Fernández R., Terraes J., Revidatti F. and Asiain M.** (2004). Variables bioquímicas en pollos sometidos a maniobras de inmovilización e inversión corporal. Rev. Vet. 15:49-51 Disponible en: http://vet.unne.edu.ar/revista/15-2/revet15-2-2004-01_Sandvl.pdf Fecha de consulta: 25/07/2009
158. **Santin E., Mairoska A., Zanella I. and Magon L.** (2000). Micotoxinas do Fusarium spp na avicultura comercial. Ciencia Rural 31:1185-1190
159. **Santin E., Maiorka A., Macari M., Grecco M., Sanchez J.C., Okada T.M. and Myasaka A.M.** (2001). Performance and Intestinal Mucosa

Development in Broiler Chickens Fed Ration Containing Saccharomyces Cerevisiae Cell Wall. J. Appl. Poult. Res., 10:236-244

160. **Santin E., Maiorka E., Krabble E. and Alessi A.** (2002). Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate on the prevention of the toxic effects of ochratoxin. J. Appl. Poult. Res. 11:22-28
161. **Santin E.** (2003a). Micotoxicosis: Demostraciones prácticas de daño en animales. Estrategias de control. En: Alltech, Re inventando la industria de los alimentos animales. Ed. Alltech [S.L.] pp 27-38
162. **Santin E., Paulillo A., Maiorka A., Okada L., Macari M., Fischer da Silva A. and Alessi A.** (2003b). Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. Int. J. Poult. Sci. 5:341-344 Disponible en: <http://www.pjbs.org/ijps/fin110.pdf> Fecha de consulta: 02/10/09
163. **Santin E.** (2005). Mold growth and mycotoxin production in The Mycotoxin blue book Nottingham University Press, Nottingham. Cap. 5 pp 93-137
164. **Santurio J. and Vieira S.** (1999). Avaliação histopatológica de frangos de corte alimentados com dietas artificialmente contaminadas com 3 ppm de aflatoxinas e suplementadas com Mycosorb®. Brasil/UFSM, UFRGS
165. **Santurio J.** (2000). Experiencia brasileira no uso de adsorbentes para aflatoxinas. En: Scussel. Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos. Florianópolis. Cap. 8 pp195-201
166. **Scheideler S.** (1993). Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin B₁ on aflatoxin toxicity, chick performance and mineral status. Poult. Sci. 72:282-288
167. **Sintox Allinat.** Adsorbente de micotoxinas Insumos para la alimentación animal Disponible en: <http://www.alinat.es/producto.aspx?qld=1> Fecha de consulta: 8/10/09
168. **Smith E., Phillips T., Ellis J., Harvey R., Kubena L., Thompson J. and Newton G.** (1994). Dietary hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of aflatoxin M₁ residue in dairy goat milk and effect on milk production and components. J. Anim. Sci. 72:677-682
169. **Smith J.** (1997). Aflatoxins. En: Handbook of Plant and Fungal Toxicants. D'Mello F. Ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida. Cap. 19 269- 285

170. **Smith T., Mac Donald J. and Haladi S.** (2001). El peligro de las micotoxinas en los alimentos y forrajes para el rendimiento animal. El éxito de un ligante biológico de micotoxinas. En: 11ª ronda latinoamericana de Altech. pp 27-37
171. **Spring P., Wenk C., Dawson K. and Newman K.** (2000). Effect of mannanoligosaccharide on different cecal parameters and on cecal concentration on enteric bacteria challenged broiler chicks. *Poult. Sci.* 79:205-211
172. **Stanley V., Ojo R., Woldesenbet S. and Hutchinson D.** (1993). The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* 72:1867-1872
173. **Starkl V.** (2008). Biotransformación, adsorción, bioprotección - Tres estrategias combinadas garantizan el éxito en el control de micotoxinas. Disponible en: http://www.engormix.com/biotransformacion_adsorcion_bioproteccion_tres_articulos_2110_MYC.htm Fecha de consulta: 10/10/09
174. **Sun X., Mc Elroy A., Webb K., Seffton J. and Novak C.** (2005). Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. *Poult. Sci.* 84:1294-1302
175. **Surai P. and Dvorska E.** (2005). Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity. En: Diaz D. *The Mycotoxin blue book* 1ª ed. Nottingham University Press, Nottingham Cap. 5 pp 93-136
176. **Swamy H., Smith T., Cotter P., Boermans H. and Setton A.** (2002a). Effect of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* micotoxins on production and metabolism in broilers. *Poult. Sci.* 81:966-975
177. **Swamy H., Smith T., Mac Donald E., Boermans H. and Squires E.** (2002b). Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* micotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent *J. Anim. Sci.* 80:3257-3267
178. **Swamy H., Smith T., Karrow N., Woodward B. and Boermans H.** (2003). Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pig and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.* 81:2792-2803
179. **Swamy H., Smith T. and Mac Donald E.** (2004a). Effect of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* micotoxins on

brain regional neurochemistry of starter pigs and broiler chickens J. Anim. Sci. 82:2131-2139

180. **Swamy H., Smith T., Karrow N. and Boermans H.** (2004b). Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* micotoxins on growth and immunological parameters of broiler chickens. Poul. Sci. 83:533-543
181. **Tardieu D., Bailly J., Benard G., Tran S. and Guerre P.** (2004). FB₁ toxicity in ducks during force-feeding. Poul. Sci. 83:1287-1293.
182. **Tardieu D., Bailly J., Skiba F., Métayer J., Grosjean F., and Guerre P.** (2007). Chronic toxicity of Fumonisin in turkeys Poul. Sci. 86:1887-1893
183. **Tedesco D., Steidler S., Galletti M., Tameni M., Sonzogni O. and Ravarotto L.** (2004). Efficacy of Silymarin-Phospholipid Complex in reducing the toxicity of aflatoxin B₁ in broiler chicks. Poul. Sci 83:1839-1843
184. **Tejada Z., Ávila E., Casaubon M., Cervantes R., Vásquez C., Hernandez M. and Moreno E.** (2008). Biodetoxification of aflatoxin contaminated chick feed. Poul. Sci. 87:1569-1576
185. **Tung H., Smith J. and Hamilton P.** (1972). Aflatoxicosis and bruising in chickens Poul. Sci. 50:795-800
186. **Tung H., Cook F., Wyatt B. and Hamilton P.** (1975). The anemia caused by aflatoxin. Poul. Sci. 54:1962-1969
187. **Watts C., Chen D., Ledoux J., Broomhead A., Bermudez A. and Rottinghaus G.** (2003). Effects of multiple mycotoxins and hydrated sodium calcium aluminosilicate in poultry. Int J. Poul. Sci 2:372-378
188. **Weibking T., Ledoux D., Bermúdez A., Turk J. and Rottinghaus G.** (1993). Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of Fumonisin B₁ on the young broiler chicks. Poul. Sci 72:456-466
189. **Weibking T., Ledoux D., Bermúdez A. and Rottinghaus 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 poults. Poul. Sci. 73:1517-1525
190. **Whitaker T., Slate A. and Johansson** (2005). Sampling feed for mycotoxin analysis. En: The Mycotoxin blue book Nottingham University Press, Nottingham. Cap.1 pp 1-23

191. **Willis W., Quarles C. and Fagerberg L.** (1982). Evaluation of Zeolites fed to male broiler chicken. *Poult. Sci.* 61:438-442
192. **Wyatt R.** (2005). Mycotoxin interactions in Diaz D. *The Mycotoxin blue book*. Ed. Nottingham University Press. 1^a ed. Cap. 12 pp269-277
193. **Yiannikouris A., François J., Poughon L., Dussap C., Bertin G., Jeminet G. and Jouany J.** (2004). Adsorption of zearalenone by β -D-Glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Food Prot.* 67:1195-1200
194. **Zaghini A., Martelli G., Roncada P. and Srizzi L.** (2005). Mannanoglicosaccharides and Aflatoxin B₁ in feed for laying hens: Effects on egg quality, aflatoxins B₁ and M₁ residues in eggs, and Aflatoxin B₁ levels in liver. *Poult. Sci.* 84:825-832
195. **Zavieso D. and Contreras M.** (2005). Impacto de hongos y micotoxinas en las aves. *Ind. Avíc.* 24:19-22