

# MORTALIDAD EMBRIONARIA EN POLLITOS CAUSADA POR AFLATOXINA B<sub>1</sub> TRASMITIDA VÍA TRANSOVÁRICA.

## Embryo Mortality in Chicken Due to Aflatoxin B<sub>1</sub> Transovarian Transmitted.

María L. Pérez-Arévalo<sup>1</sup>, Elías Ascanio<sup>2</sup>, Jorge Soto Bracho<sup>1</sup>, Rafael Román<sup>1</sup>, Darwain Arrieta<sup>2</sup> e Hirwin Rincón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. <sup>2</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. E-mail: lourdesperes@cantv.net

### RESUMEN

Se estudió el efecto de la aflatoxina B<sub>1</sub>, transmitida vía transovárica, sobre la mortalidad embrionaria en aves. Para ello se realizó una investigación de tipo experimental donde se utilizaron 30 gallinas de la línea Isa Brown divididas en 3 grupos de 10 aves cada uno, las cuales fueron sometidas a inseminación artificial para obtener huevos fértiles, recibiendo alimento contaminado con aflatoxina B<sub>1</sub> durante 10 días de la siguiente manera: tratamiento 1, niveles no detectables (control); tratamiento 2, 0,02 mg/kg y tratamiento 3, 4 mg/kg. Se obtuvieron 246 huevos fértiles correspondiendo a dos lotes de incubación: lote A, huevos recogidos durante los últimos 7 días de administración de la toxina y lote B, huevos recogido durante los 7 días posteriores al consumo de la toxina; estos huevos fueron identificados por tratamiento y por lote de incubación, observándose mediante un ovoscopio para determinar la mortalidad embrionaria. Los resultados obtenidos demostraron que la mortalidad estuvo afectada por la administración de aflatoxina B<sub>1</sub> a la dosis de 4 mg/kg (tratamiento 3) para los lotes A y B (P<0,01).

**Palabras clave:** Aflatoxina B<sub>1</sub>, mortalidad, embrión, pollos.

### ABSTRACT

The effect of transovarian transmitted aflatoxin B<sub>1</sub> in the poultry embryo mortality was studied. An experimental trial was performed with 30 Isa Brown hens, distributed in three group of ten each. In order to obtain fertile eggs hens were inseminated. During ten days they were fed with aflatoxin contaminated food as following: treatment 1; no detectable (control), treatment 2; 0.02 mg/kg, treatment 3; 4 mg/kg. 246 fertile eggs were obtained from two different incubation lots. Lot A: eggs collected during the last 7 days of the toxin administration and lot B:

eggs collected along the seven days after the toxin administration. The eggs were classified by treatment and incubation lot, the embryo mortality was evaluated using an ovoscopy. Embryo mortality was significantly affected by treatment 3 (4 mg/kg), lots A and B (P<0.01).

**Key words:** Aflatoxin, mortality, embryo, chicken.

### INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos principalmente por algunas cepas de hongos del género *Aspergillus*, describiéndose generalmente la aflatoxina B<sub>1</sub> como un compuesto altamente hepatóxico en aves [1]. En gallinas, la distribución de aflatoxinas en tejidos es muy amplia y los estudios sobre sus metabolitos han confirmado la transferencia al ovario y huevos, así como a la progenie incubada [16, 27], lo cual puede traer como consecuencia disminución de la fertilidad e incubabilidad, mortalidad embrionaria y nacimiento de pollitos débiles. Es importante tener en cuenta que alteraciones de estos aspectos reproductivos y de la progenie, ocasionan graves pérdidas económicas inmediatas, además de comprometer el futuro y la productividad de esta especie.

Investigaciones en gallinas ponedoras, refieren que las aflatoxinas causan una disminución en la producción de huevos dos o cuatro semanas después de haber sido ingerida la toxina y, en reproductoras pesadas, observaron disminución en la producción de huevos fértiles [14, 22]. Otros estudios demostraron disminución de la calidad del huevo al reducir el peso de la yema al administrar aflatoxina B<sub>1</sub> en concentraciones de 2,5 ppm durante cuatro semanas [23].

Ensayos donde se les suministro alimento contaminado con aflatoxinas a gallinas reproductoras concluyeron que en niveles de 0,2 y 1,0 ppm, los efectos sobre el desarrollo embrionario fueron mínimos, pero que con dosis de 5,0 ppm de aflatoxinas, la mortalidad embrionaria se incremento significati-

vamente [21]. Las aflatoxinas, además de afectar la producción y salud animal, tienen importancia desde el punto de vista de la salud pública por tener un efecto carcinogénico, pudiendo el hombre estar expuesto a estas toxinas de manera directa por ingestión de granos, cereales o frutas contaminadas o indirectamente por la ingestión de carne, huevos o leche con residuos de las mismas [3, 13, 28].

El conocimiento de los efectos de la aflatoxina B<sub>1</sub> transmitida vía transovárica permitirá estimar las pérdidas económicas producidas por ésta, producto de la disminución en el número de nacimientos debido a la mortalidad embrionaria. Los resultados obtenidos en esta investigación pueden ser generalizados a toda la población avícola nacional y mundial, además servirá para concientizar a los avicultores de exigir, se implementen medidas de evaluación y control de estas toxinas en las materias primas y alimentos terminados. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la aflatoxina B<sub>1</sub>, transmitida vía transovárica sobre la mortalidad embrionaria en aves.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una investigación de tipo experimental la cual se desarrolló en las instalaciones de la Unidad Experimental Avícola del INIA en Turmero, estado Aragua, Venezuela, utilizándose 30 gallinas ponedoras de la línea Isa Brown, divididas en 3 grupos de 10 aves cada uno, las cuales fueron seleccionadas por productividad (más de 80% de producción), contándose con un comedero de canal, un colector de huevos lineal y un bebedero tipo copita para cada dos jaulas, según recomendaciones emitidas por la empresa productora de la línea genética Isa Brown [15].

Quince días previos al inicio del ensayo, a las gallinas les fue suministrado alimento fabricado con granos recién cosechados, para evitar contaminación por hongos y producción de micotoxinas, con las siguientes características: 2.750 kcal y 16% de proteína; se comprobó la ausencia de aflatoxina B<sub>1</sub> analizándose según el método cuantitativo fluorimétrico VICAN VI.0, esto con el objeto de eliminar posibles residuos de aflatoxina que existiera en sus organismos, basándose en lo referido por Chen y col. [6], quienes no detectaron aflatoxinas en ningún tejido de pollos de engorde 4 días después de finalizado el consumo de alimento con la toxina, y en trabajos realizados por Sawhney y col. [24], donde se reporta que el tiempo necesario para eliminar las aflatoxinas del cuerpo de las gallinas ponedoras es de 66,82 horas.

Al mismo tiempo se entrenaron 5 gallos de la estirpe Gold Line para la extracción de semen, ya que las gallinas fueron sometidas a 4 inseminaciones artificiales, una cada 5 días a partir del primer día de consumo del alimento contaminado con aflatoxina; la práctica de inseminación se realizó en dos pasos: primero, el semen fue recolectado de los gallos por masaje abdominal formándose un pool de semen, y segundo, el

semen fue depositado dentro del tracto reproductor de las gallinas sin ser sometido a dilución ni conservación [4,12].

Una vez cumplido el periodo de 15 días previos al inicio del ensayo, las aves recibieron alimento contaminado con aflatoxina B<sub>1</sub> durante 10 días de la siguiente manera: tratamiento 1= alimento sin niveles detectables aflatoxina B<sub>1</sub> (control); tratamiento 2= alimento con 0,02mg/kg de aflatoxina B<sub>1</sub>; tratamiento 3= alimento con 4mg/kg de aflatoxina B<sub>1</sub>.

El alimento fue contaminado con aflatoxina B<sub>1</sub> pura de *Aspergillus flavus*, procedente de Laboratorios Sigma (EUA), fue pesada en las cantidades suficientes para lograr las concentraciones deseadas de 0,02 mg/kg y 4 mg/kg, para posteriormente realizar la mezcla en la cantidad de alimento a ser ingerida por las aves de cada grupo tratado, estimándose una ingestión de 115 g/ave/día, según normas de manejo Isa Brown [15]. Dos muestras de cada uno de estos alimentos fueron nuevamente evaluadas, según el método anteriormente mencionado, para así verificar las concentraciones deseadas de la toxina y la homogeneidad del mezclado.

Las concentraciones de aflatoxina utilizadas se basaron, en el caso del tratamiento 2 (0,02 mg/kg), en la cantidad máxima de aflatoxinas admitida para aves en Venezuela [10] y para el tratamiento 3 (4 mg/kg) en el trabajo realizado por Qureshi y col. [21], donde niveles de 5 mg/kg de aflatoxinas produjeron una importante disminución del porcentaje de producción e incubabilidad de los huevos.

Se obtuvieron 246 huevos fértiles entre el día 4° de iniciado el tratamiento, hasta el día 7° después de haberse concluido, ambos inclusive, para un total de 14 días, y cada uno fue identificado por tratamiento (1, 2, 3) y por lote de incubación (A, B), la asignación por lotes se realizó de la siguiente manera: Lote A, los huevos recogidos entre el día 4° y 10° de iniciado el tratamiento (siete días durante la administración de la toxina). Lote B, los huevos recogidos entre los días 11° y 17° de iniciado el tratamiento (siete días posteriores a la administración de la toxina).

Los huevos fértiles, después de recolectados, seleccionados e identificados, fueron sometidos a un pre-enfriamiento a 18°C – 22°C durante 2 ó 3 horas antes de ser llevados a refrigeración a una temperatura de 15°C – 16°C, con una humedad relativa de 75-80%, allí fueron almacenados durante 7 días [18, 20] y posteriormente fueron trasladados a una incubadora modelo Robbins (EVA), con capacidad de diez mil huevos. En la incubadora, los huevos permanecieron durante 18 días a una temperatura de 99°F – 100°F y humedad relativa de 52- 54%, donde se realizaron 24 volteos diarios de los huevos; el día 19 de incubación, los huevos fértiles fueron trasladados a la nacedora con una temperatura de 97°F – 98°F y una humedad relativa de 65% – 70% [7,17,18,19].

El análisis estadístico [25] para la mortalidad embrionaria se realizó mediante un diseño completamente al azar con

los datos ceros y unos, representando los resultados de muertos y vivos, respectivamente, sin embargo, la variable clasificatoria tratamiento incluyó un arreglo factorial formado por los tratamientos (0 mg/kg, 0,02 mg/kg y 4 mg/kg), y la fase del experimento (7 días durante la administración de la toxina y 7 días después de la misma).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos sobre la mortalidad embrionaria demuestran que la misma estuvo afectada por la administración de aflatoxina B<sub>1</sub>, o de sus metabolitos, transmitidos vía vertical a concentraciones de 4mg/kg (tratamiento 3), tanto para el lote A como para el lote B (26,19% y 21,92% de mortalidad, respectivamente), mientras que los embriones provenientes de las gallinas que consumieron aflatoxina B<sub>1</sub> en concentración de 0,02mg/kg (tratamiento 2) y controles (tratamiento 1), en los lotes A y B, presentaron mortalidades inferiores al 11%. En la TABLA I pueden observarse los resultados en número absoluto y en porcentaje de los embriones muertos y de sobrevivientes, tanto para el lote A como para el lote B en los tres tratamientos.

Estos resultados fueron procesados utilizándose un análisis de varianza para la mortalidad embrionaria, donde se evidencia diferencia significativa entre tratamientos ( $P < 0,01$ ), pero no muestra diferencias entre los lotes del experimento ni para la interacción entre tratamientos con lote (TABLA II). En la TABLA III se presentan las proporciones de mortalidad, observándose que el grupo control (tratamiento 1) y el grupo al que se le administró una concentración baja de aflatoxina B<sub>1</sub> (tratamiento 2) no fueron diferentes, sin embargo, la comparación del grupo control con el grupo que consumió altos niveles (tratamiento 3) claramente indican que existió un incremento en la mortalidad embrionaria ( $P < 0,01$ ). Asimismo, la comparación de los dos grupos tratados con la aflatoxina B<sub>1</sub> (tratamientos 2 y 3) fue estadísticamente diferente.

En la TABLA IV puede observarse la mortalidad embrionaria discriminada por día de incubación, notándose que las muertes embrionarias se concentran en los tratamientos 1 y 2 antes de los primeros 7 días de incubación, mientras que para el tratamiento 3 se observa una tendencia a ocurrir mortalidades en las fases finales del periodo de incubación (después de

los 12 días), además de la ocurrida antes de los 7 días de incubación, a semejanza de los tratamientos 1 y 2.

Estudios previos [2], utilizando niveles de 200 ppb durante 22 semanas en ponedoras, demuestran la transferencia de aflatoxina B<sub>1</sub> dentro del huevo y concluyen que la concentración de aflatoxina B<sub>1</sub> en el huevo se incrementa durante el periodo experimental, presentando su nivel máximo a las nueve semanas de iniciado el tratamiento. Igualmente, otros estudios [27] detectaron en huevos aflatoxicol y aflatoxina B<sub>1</sub> después de administrar en la dieta de las gallinas aflatoxina B<sub>1</sub> en niveles de 8 mg/kg por 7 días. Otros autores [3, 16] encontraron aflatoxinas en el interior de huevos en cantidades mensurables, tanto en la yema como en la albúmina.

El efecto embriotóxico de la aflatoxina B<sub>1</sub> fue demostrado al inocular huevos embrionados de 6 y 12 días de edad con 0,1 µg de aflatoxina B<sub>1</sub>, encontrando una disminución en el hematocrito y en la concentración de hemoglobina, al compararlo con el control [11]. De la misma manera, otros estudios [8], reportaron un incremento en la mortalidad embrionaria cuando los embriones fueron inyectados con aflatoxina B<sub>1</sub> dentro de los huevos después de las 96 horas de incubación, observando que con dosis de 1/100 ppm y de 1/500 ppm de aflatoxina B<sub>1</sub> las mortalidades fueron de 35% y 26%, respectivamente, mientras que en el grupo control fue de 6,6%.

Investigaciones con niveles de 5 mg/kg y 10 mg/kg de aflatoxina B<sub>1</sub> en reproductoras durante 4 semanas, observaron que la incubabilidad de los huevos recogidos durante la primera semana de tratamiento resultó en 95,1, 68,9 y 48,5% para el grupo control, 5 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente [14]. Otros autores inyectaron aflatoxina B<sub>1</sub> a dosis de 10, 100 y 1000 ng/huevo, observando mortalidad embrionaria que aumentó proporcionalmente a la dosis suministrada y con la dosis más alta se produjeron mortalidades tempranas, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo [5].

Stoloff y col. [26], también inyectaron dentro del huevo, vía cámara de aire, aflatoxina B<sub>1</sub> en dosis de 0,20 mg/huevo, 0,10 mg/huevo, 0,05 mg/huevo, 0,021 mg/huevo y 0,010 mg/huevo y aflatoxina P<sub>1</sub> en niveles de 0,190 mg/huevo, 0,150 mg/huevo, 0,075 mg/huevo, 0,0375 mg/huevo, 0,019 mg/huevo y 0,0075 mg/huevo y observaron que al utilizar aflatoxina B<sub>1</sub> ocurrió una mortalidad embrionaria que varió entre el 70% y el 100%, dependiendo de la dosis utilizada,

**TABLA I**  
**MORTALIDAD EMBRIONARIA EN NÚMERO Y PORCENTAJE/ EMBRYO MORTALITY IN NUMBER AND PORCENTAGE**

Tratamiento	Lote A						Lote B					
	Muertos		Vivos		Total		Muertos		Vivos		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
1 (control)	4	8,69	42	91,3	46	100	4	10,52	34	89,47	38	100
2 (0,02 mg/kg)	1	2,43	40	97,56	41	100	4	10,52	34	89,47	38	100
3 (4 mg/kg)	11	26,19	31	73,80	42	100	9	21,92	32	78,04	41	100
Total	16		113		129		17		100		117	

**TABLA II**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA MORTALIDAD**  
**EMBRIONARIA/ ANALYSIS OF VARIANCE IN ORDER**  
**TO EMBRYO MORTALITY**

Fuente de Variación	GL	Suma de cuadrados	F	Pr < F
Tratamiento	2	1,4418	6.42	0.0010
Lote	1	0,0219	0.20	0.6587
Trat*Lote	2	0,1536	0.68	0.5053
Error	240	26,9291		
Total	245	28,5732		

**TABLA III**  
**PROPORCIONES DE MORTALIDAD PARA LOS**  
**DIFERENTES TRATAMIENTOS/ MORTALITY PROPORTIONS**  
**IN ORDER TO DIFFERENTS TREATMENTS**

Tratamiento	Medias	error típico
1 (control)	9,62 <sup>a</sup>	0,037
2 (0,02 mg/kg)	6,48 <sup>a</sup>	0,037
3 (4 mg/kg)	24,07 <sup>b</sup>	0,037

Medias marcadas con letras diferentes difieren estadísticamente (P<0,01).

**TABLA IV**  
**MORTALIDAD EMBRIONARIA DISCRIMINADA POR DÍA**  
**DE INCUBACIÓN/ EMBRYO MORTALITY DISCRIMINATING**  
**FOR INCUBATION DAY**

Lote	Tratamientos	1° al 7° día de incubación	8° al 18° día de incubación	Total
A	1 (control)	4	0	4
	2 (0,02 mg/kg)	1	0	1
	3 (4 ,mg/kg)	2	9	11
B	1 (control)	4	0	4
	2 (0,02 mg/kg)	4	0	4
	3 (4 ,mg/kg)	4	5	9

Medias marcadas con letras diferentes difieren estadísticamente (P<0,01).

mientras que con la aflatoxina P<sub>1</sub> las mortalidades no variaron con respecto al control.

Aves alimentadas desde el primer día de edad hasta los 188 días con alimento contaminado con aflatoxina B<sub>1</sub> en cuatro niveles, 0 ppb, 308 ppb, 610 ppb y 1.834 ppb, encontrando que con los niveles de 0 ppb y 308 ppb la incubabilidad fue similar, aumentando ésta al nivel de 610 ppb y que con dosis de 1.834 ppb no hubo huevos incubados, ya que ocurrió una mortalidad embrionaria en los primeros 6 días de incubación [9], esto último no concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde se observaron mortalidades embrionarias después de los 6 días de incubación, lo cual probablemente sea debido a los diferentes tiempos de exposición a la toxina.

## CONCLUSIONES

La mortalidad embrionaria estuvo afectada significativamente (P<0,01) por la aflatoxina B<sub>1</sub> transmitida vía transovárica a dosis de 4 ppm, alcanzando un 26,19% en el lote A de incubación y un 21,92% en el lote B de incubación.

## RECOMENDACIONES

Determinar y cuantificar la presencia de aflatoxina B<sub>1</sub> en hígado y ovario de gallinas que consumen alimento contaminado con esta toxina.

Evaluar el efecto de la aflatoxina B<sub>1</sub> sobre la fertilidad, tanto en gallos como en gallinas.

Evaluar el efecto de la aflatoxina B<sub>1</sub> transmitida vía transovárica sobre la mortalidad embrionaria utilizando diferentes líneas genéticas de gallinas reproductoras.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo, así como a la Unidad Experimental Avícola del INIA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARRIETA, D. M.; PÉREZ, A. M.; GÓMEZ, C.; MOLERO, G.; NOVOA, E.; RINCÓN, H.; ASCANIO, E. Efecto del alimento contaminado con aflatoxina B<sub>1</sub> (0,07 mg/kg) sobre la morfología hepática y actividad enzimática sérica (AST y ALT) en pollos de engorde. **Rev Científ. FCV-LUZ**. XVI (1):39-47. 2006.
- [2] AZZAM, A. H.; GABAL, M. A. Aflatoxin and immunity in layer hens. **Avian Pathol**. 27 (6): 570-577. 1998.
- [3] BINTVIHOK, A.; THIENGNIN, S.; DOI, K.; KUMAGAI, S. Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. **J Vet Med Sci**. 64 (11):1037-1039. 2002.
- [4] BONADONA, T. La Inseminación Artificial en Aves. En: **Reproducción Animal e Inseminación Artificial**. Tomo II. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 437-439 pp. 1989.
- [5] CELIK, I.; OGUZ, H.; DEMET, Q.; BOYDA, K.; DONMEZ, H.; NIZAMLIOGLU, F. Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRRL. 2999. **Br Poult Sci**. 41 (4): 401-409. 2000.
- [6] CHEN, C.; PEARSON, A. M.; COLEMAN, T.H.; GRAY, J. I.; PESTKA, J. J.; AUST, S. D. Tissue deposition and clearance of aflatoxins from broiler chickens fed a contaminated diet. **Food and Chem. Toxicol**. 22 (6): 447-451. 1984.

- [7] CHICK MASTER INCUBATOR COMPANY. Pautas Operativas para una Alta Incubabilidad. USA. 20-32 pp. 1995.
- [8] CILIEVICI, O.; GHIDUS, C. E.; MOLDOVAN, A. The toxin and teratogenic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on the chick embryo development. **Morphol. Embryol.** 26 (4): 309-314. 1980.
- [9] COTTIER, G.; MOORE, C.; DIENER, U. The effects of feeding four levels of aflatoxin on hatchability and subsequent performance of broilers. **Poult. Sci.** 48 (5): 1797-1801. 1969.
- [10] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (**COVENIN**). Normas Venezolana Alimento Completo para Aves. Ministerio de Fomento. Método de Ensayo para Determinar Aflatoxina (1603). Caracas, Venezuela. 1181-83pp. 1983.
- [11] DIETERT, R.; BLOOM, S. E.; QURESHI, M. A.; NANNA, U. C. Hematological toxicology following embryonic exposure to aflatoxin B<sub>1</sub>. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** 173 (4): 481-483. 1983.
- [12] HAFEZ, E. S. Aves. Cap. 18: En: **Reproducción e Inseminación en Animales.** 5ta. Ed. Editorial Interamericana. México. 410-429 pp. 1989.
- [13] HOERR, F. J. Micotoxicosis. En: **Enfermedades de las Aves.** (Ed. B. W. Calnek). 2 Ed. Editorial Manual Moderno, México. 1094-1130 pp. 1995.
- [14] HOWARTH, J.; WYATT, R. Effect of dietary aflatoxin on fertility hatchability and progeny performance of broiler breeder hens. **Appl. and Environ. Microbiol.** 35 (5): 680-684. 1976.
- [15] ISA BROWN. **Guía de Manejo.** Service Production et Assistance Technique. Francia. 32 pp. 1996.
- [16] JACOBSON, W. C.; WISEMAN, H. G. The transmisión of aflatoxin B<sub>1</sub> into eggs. **Poult. Sci.** 53 (5): 1743-1745. 1974.
- [17] LEESON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. Aflatoxins. In: **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins.** University Books. Guelph, Ontario, Canada. 249-298 pp. 1995.
- [18] MAGRAN, R. Mirando y hablando de plantas de incubación. **Seminario Internacional de Incubación en Venezuela.** Chick Master Internacional, Inc. Venezuela, 24-25 de mayo. 34-39 pp. 1989
- [19] MAULDIN, J. M.; BUHR, R. J. Recognize problems in embryonic development. **Poult Misset Internat.** 5 (6): 20-25. 1990.
- [20] MOLINA, O. Manejo de huevos para incubar. **Seminario Internacional de Incubación en Venezuela.** Chick Master Internacional, Inc. Venezuela, 24-25 de mayo. 61-68 pp. 1989
- [21] QURESHI, M. A.; BRAKE, J.; HAMILTON, P. B.; HAGLER, W.M.; NESHEIM, S. Dietary exposure of broiler breeders to aflatoxin results in immune dysfunction in progeny chicken. **Poult Sci** 77(6):812-9.1998.
- [22] PÉREZ, M. L.; SOTO, B. J.; ROMÁN, R.; ANGULO, I.; ARRIETA, D.; VALERIS, R. Efectos de la aflatoxina B<sub>1</sub> sobre la producción de huevos de consumo. **Rev Cientif FCV-LUZ.** XI (4):337-341. 2001.
- [23] RIZZI, L.; SIMIOL, M.; ROMCADA, P.; ZAGHINI, A. Aflatoxin B<sub>1</sub> and clinoptilolite in feed for laying hem: effects on egg quality, micotoxin residues in livers and hepatic mixed-funtion oxigenase activities. **J Food Prot.** 66 (5): 860-865. 2003.
- [24] SAWHNEY, D. G.; VADEHARA, D. V.; BAKER, R. C. The metabolism of 14 C aflatoxins in laying hens. **Poult Sci.** 52 (4): 1302-1309. 1973.
- [25] STATISTICAL ANÁLISIS SYSTEM INSTITUTE (**SAS**). User's guide version 6,12. Cary, NC. 1994.
- [26] STOLOFF, L.; VERRETT, J.; DANTZMAN, J.; REYNALDO, E. Toxicological Study of aflatoxin P1 using the Fertile Chicken Egg. **Toxicol. and Applied Pharmacol.** 23 (3): 528-5331. 1972.
- [27] TRUCKSESS, M. W.; STOLOFF, L.; YOUNG, K. Aflatoxicol and aflatoxins B<sub>1</sub> and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin contaminated feed. **Poult. Sci.** 62 (11): 2176-2182. 1983.
- [28] VAAMONDE, G. Micotoxinas. En: **Toxicología de los Alimentos A. A. Silvestre,** (Ed). 2<sup>da</sup> Ed. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 153-193 pp. 1996.