

# 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

## Effect of Foodstuff Contaminated with Aflatoxin B<sub>1</sub> (0.07 mg/kg) on Liver Morphology and Serum Enzymes (AST Y ALT) Activity in Broiler Chickens

Darwain Arrieta Mendoza<sup>1\*</sup>, María Pérez-Arévalo<sup>2</sup>, Carlos Gómez<sup>3</sup>, Gladys Molero<sup>4</sup>, Elizabet Novoa<sup>5</sup>, Hirwin Rincón<sup>2</sup> y Elías Ascanio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Farmacología y Toxicología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. <sup>3</sup>Sistema Regional de Salud-Estado Mérida.

<sup>4</sup>Sistema Regional de Salud-Estado Zulia. <sup>5</sup>Unidad de Electroforesis, Instituto Hematológico de Occidente estado Zulia.

Tel: 0416-7627305 / Fax: 0261-7880401. E-mail: darwain@yahoo.com

### RESUMEN

El presente ensayo fue conducido para determinar el efecto del alimento contaminado con 0,07mg/kg (70 ppb) de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), sobre la morfología hepática y actividad enzimática sérica de Aspartato-aminotransferasa (AST) y Alanino-aminotransferasa (ALT) en pollos de engorde, a fin de evaluar su toxicidad. Un total de 120 pollos del híbrido comercial Hubbar × Hubbar, machos, de un día de nacidos, fueron asignados al azar para recibir 2 tipos de dietas durante 42 días, cada una con 4 réplicas de 15 pollos, éstas correspondieron a los siguientes tratamientos (T) T<sub>1</sub>: grupo control que consiste en alimento comercial (AC) sin niveles detectables de aflatoxina y T<sub>2</sub>: AC + 0,07mg/kg de AFB<sub>1</sub>. Se tomaron 8 aves al azar por tratamiento (dos por réplica) de las cuales se obtuvo muestras de suero sanguíneo y sus respectivos hígados para la evaluación morfológica. Al comparar los promedios de pesos hepáticos relativos de ambos tratamientos no se detectó diferencia significativa y no se observaron lesiones macroscópicas en los hígados de ambos grupos. Microscópicamente, las muestras de hígados del T<sub>2</sub>, presentaron lesiones hepatotóxicas de leve a moderada, observándose en algunos casos lesiones características de micotoxicosis hepática leve (proliferación y dilatación de conductos biliares). La ingestión de 0,07mg/kg de AFB<sub>1</sub> en el alimento, no alteró significativamente la actividad enzimática sérica de ALT, pero sí disminuyó (P < 0,05) la actividad sérica de AST. Estos resultados sugie-

ren que el consumo de alimento con bajas concentraciones de AFB<sub>1</sub> (0,07mg/kg), pueden causar hepatotoxicidad en pollos de engorde e inducir aflatoxicosis crónica.

**Palabras clave:** Aflatoxina, lesión, hígado, enzimas, pollo.

### ABSTRACT

This trial was undertaken to assess the effect of feed contaminated with 0.07mg/kg of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), on liver morphology and serum enzymes activity of Aspartate-aminotransferase (AST) y Alanino-aminotransferase (ALT) in broiler chickens in order to determine its toxicity. One hundred and twenty Hubbar × Hubbar male one-day-old chickens were assigned randomly to be eaten with 2 types of diets for 42 days. Diets consisted of 4 replicates of 15 chickens each and represented the following treatments (T) T<sub>1</sub>: control group consisting of market foodstuff (MF) without detectable levels of aflatoxin and T<sub>2</sub>: MF + 0.07mg/kg de AFB<sub>1</sub>. Eight chickens were taken randomly for each treatment (two per replicate), from which serum samples and livers were extracted for morphological evaluation. When relative liver weight means from both treatments were compared, no significant difference and no macroscopic lesions were observed in the livers of both groups. Microscopically, T<sub>2</sub> liver samples showed mild to moderate hepatotoxic lesions. In some cases, bile duct proliferation was observed. Foodstuff with 0.07mg/kg de AFB<sub>1</sub>, did not alter significantly ALT serum enzymatic activity, but did decrease (P < 0.05) AST serum activity. These results suggest that the consumption of feed contaminated with low level of AFB<sub>1</sub> (0.07 mg/kg) should cause

hepatotoxicity in broiler chickens and was to induce chronic aflatoxicosis.

**Key words:** Aflatoxin, lesion, liver, enzymes, chicken.

## INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos principalmente por algunas cepas de hongos del género *Aspergillus*. De estos metabolitos fungales se describe con mayor frecuencia la aflatoxina B<sub>1</sub> como un compuesto altamente tóxico para la mayoría de las especies animales [26] y pertenece al conjunto de micotoxinas de importancia en salud pública, por ser sustancias carcinogénicas [12], detectándose frecuentemente en semillas o materias primas vegetales donde estos hongos proliferan [18]. Las aflatoxinas son muy termoestables, por lo que la peletización de los alimentos balanceados elaborados con materias primas contaminadas puede destruir el hongo, pero no la toxina [38]. Estudios en Venezuela [13] sobre materias primas destinadas a elaborar alimentos balanceados para aves detectaron aflatoxinas en harina de maíz con niveles superiores (0,0341 mg/kg) a los máximos permitidos (0,02 mg/kg), para la alimentación animal [7] y a los establecidos por el Departamento de Alimentos y Drogas de EEUU. [4].

Las aves de corral están expuestas a las aflatoxinas al consumir alimentos fabricados con materias primas contaminadas; las micotoxicosis producidas por aflatoxina B<sub>1</sub> además de incidir en la salud de las aves [5, 37] reducen la producción avícola [34, 38, 39], afectando la disponibilidad de ciertos productos y su comercialización. Asimismo, la carne de pollo puede contener residuos de aflatoxina especialmente en hígado [26] lo que representa un riesgo de salud pública, porque aún las cantidades mínimas en la dieta humana pueden causar efectos irreversibles [6, 49].

Los efectos de la aflatoxina dependen principalmente del tiempo de exposición y la dosis [26]. Las aflatoxicosis experimentales inducidas en pollos de engorde por dietas contaminadas, generalmente han utilizado concentraciones en niveles considerables (1-5 mg/kg ó ppm) que permiten obtener con frecuencia cambios morfológicos en tejidos y signos clínicos agudos en breves periodos de exposición [35, 36, 45]. Estas lesiones pueden producir en aves de corral cambios en la actividad sérica de varias enzimas especialmente de aquellas que están relacionadas con el hígado [26], describiéndose frecuentemente variaciones significativas en la actividad sérica de la Aspartato-aminotransferasa (AST) y Alanino-aminotransferasa (ALT) en pollos de engorde [1, 3, 44].

Estos hallazgos se reportan frecuentemente en hígado considerado el órgano blanco en las aflatoxicosis observándose macroscópicamente hepatomegalia, bordes del órgano redondeados, consistencia flácida, hemorragias petequiales en superficie, palidez con decoloración amarillenta del órgano [15,

41, 45] y microscópicamente se describe degeneración lipídica con vacuolación grasa del citoplasma de los hepatocitos y necrosis, aumento de tamaño del núcleo, cariomegalia y rápida proliferación de los conductos biliares [23, 40, 45].

Las investigaciones con bajas concentraciones de aflatoxina por mayores periodos de exposición, generalmente reportan efectos subclínicos y no por ello menos nocivos, los cuales frecuentemente son demostrados por pruebas o exámenes hepáticos muy sensibles que permiten detectar la autentica severidad de la aflatoxicosis inducida en las aves [10, 30, 33]. No obstante los cambios en la actividad enzimática en suero indican que la administración continua de aflatoxina causa severos daños hepatocelulares, estos pueden manifestarse en necrosis o alguna otra alteración que incremente la permeabilidad celular, causando liberación de enzimas dentro del suero [44].

Aun cuando en el país se ha demostrado que las aflatoxinas están presentes en las materias primas utilizadas para los alimentos balanceados de las parvadas en niveles variables [13, 28], no se ha evaluado profundamente el perfil hepático de las aves ante un agente biotóxico específico de este órgano, mediante parámetros que determinen alteraciones en la estructura y funcionamiento del tejido hepático manejando bajas concentraciones de aflatoxina en la dieta.

Debido a las consideraciones descritas anteriormente y la importancia de realizar nuevos estudios en aves sometidas a aflatoxicosis experimentales, para contribuir en la salud y producción avícola, se plantea esta investigación que tiene por objetivo determinar el efecto del alimento contaminado con 0,07mg/kg de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), sobre la morfología hepática y actividad enzimática en suero (AST y ALT) en pollos de engorde a los 42 días, a fin de evaluar el grado de toxicidad de esta concentración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación geográfica del estudio

El experimento se realizó en el Centro Experimental de Producción Animal (CEPA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, ubicado en el municipio La Cañada de Urdaneta del estado Zulia, Venezuela; la zona es clasificada como un bosque seco tropical con una temperatura promedio de 30°C y una precipitación que oscila entre 125 y 500 mm/año.

### Manejo de las aves

Se utilizaron 120 pollos híbridos Hubbar × Hubbar, machos, de un día de edad, procedentes de una incubadora comercial, seleccionados y luego vacunados contra las enfermedades de Marek (Herpes Virus de Pavo), Gumboro (cepa intermedia) y Newcastle (cepa La Sota), con una revacunación a los 7 y 16 días de edad contra Gumboro y Newcastle. Las

aves fueron pesadas y separadas en 8 replicas de 15 pollos cada una y fueron distribuidos al azar en 8 corrales con criadoras (1ª semana) de tres metros cuadrados (2 × 1,5 m) cada uno, a razón de 5 aves/m<sup>2</sup>, con divisiones de 0,70m de altura. Los corrales se ubicaron dentro de un galpón avícola de 35m de longitud por 6m de ancho y 2,7m de altura, cubierto con una malla metálica. El galpón se desinfectó y fumigó previamente para el control de insectos y se le dio un periodo de 20 días de descanso, luego se le colocaron cortinas de polietileno y el piso fue cubierto con una cama de concha de arroz previamente fumigada sobre la cual se ubicaron los 8 corrales, donde las aves permanecieron durante 42 días con agua y alimento administrados *ad libitum*.

### Experimento

El experimento se realizó con un diseño completamente al azar, donde se emplearon 2 tipos de dietas experimentales cada una con un total de 60 pollos distribuidos al azar en 4 replicas de 15 aves por corral. Estas dietas correspondieron a los siguientes tratamientos (T) T<sub>1</sub>: grupo control que consiste en alimento comercial (AC) sin niveles detectables de aflatoxina y T<sub>2</sub>: AC contaminado con 0,07mg/kg de AFB<sub>1</sub>.

### Alimento

El alimento de la dieta control utilizado para este experimento fue producido en una fábrica de alimento comercial (a base de maíz, sorgo venezolano y harina de soya), sin niveles detectables de aflatoxinas. Se emplearon dos tipos de alimentos balanceados en el ensayo: iniciador (Proteína: 23,2%; Grasa: 8,4%; Fibra: 2,8%; Energía Metabolizable EM/kg MS: 3150 Kcal) que se ofreció a las aves desde el día 1 hasta el día 21 y el alimento terminador (Proteína: 19%; Grasa: 10,5%; Fibra: 2,9%; Energía Metabolizable EM/kg MS: 3000 Kcal) desde el día 22 al día 42 del experimento, elaborados en función de los requerimientos de la línea genética de los pollos de engorde y suplementados con aminoácidos, vitaminas y minerales bajo las formulaciones indicadas por National Research Council [32]. En ambos tipos de alimento los valores son calculados, mientras en la energía metabolizable (EM/kg MS) los valores fueron tabulados en ambos alimentos.

El alimento balanceado fue contaminado de manera artificial con aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) purificada (98 %) procedente de *A. flavus* de laboratorios Sigma (elaborado en Israel, catalogo Nº A6536/4), presentado en forma liofilizada. Antes de hacer la contaminación total de la dieta experimental (T<sub>2</sub>) con la toxina, se diluyó 50mg de AFB<sub>1</sub> en 8ml de Acetonitrilo (manufacturado por Burdick & Jackson Inc USA. Cat. 015-4), esta solución se agregó en 2 kilogramos de alimento balanceado contenidos en un envase de vidrio y luego se mezcló por 4 horas en un agitador mecánico.

Posteriormente se agregaron los 2kg de alimento previamente contaminado al resto del alimento comercial, en un mezclador y agitador de doble cinta con capacidad para mez-

clado de 200kg hasta obtener una concentración final de AFB<sub>1</sub> a 0,07mg/kg en el T<sub>2</sub>. Esta concentración se basó en experimentos que han demostrado un significativo incremento de lípidos hepáticos en pollos de engorde que recibieron dietas con AFB<sub>1</sub> [10].

### Detección de aflatoxina en alimento y prueba de recuperación de aflatoxina

Por cada dieta (tratamiento) se tomaron 4 muestras de alimento antes y después de la contaminación con AFB<sub>1</sub>. La detección se efectuó mediante el uso de un fluorómetro VICAM Serie-4, Modelo VICAM VI,0, especialmente diseñado para análisis de micotoxinas con las columnas de inmunoafinidad VICAN [2]. La prueba de recuperación de AFB<sub>1</sub> se ejecuto por triplicado sobre la matriz del alimento balanceado empleado en el estudio, utilizando patrones de referencia con concentraciones de 0mg/kg, 0,05mg/kg, 0,08mg/kg y 0,18mg/kg. Los resultados indicaron que el alimento comercial balanceado utilizado como matriz en el ensayo estaba libre de aflatoxina y el alimento contaminado con fines experimentales registró una concentración promedio de 0,07mg/kg de AFB<sub>1</sub>. Este resultado se obtuvo utilizando el valor de concentración de AFB<sub>1</sub> detectada por el equipo y corregido en función de un 81,25% de recuperación, estimado para la columna utilizada mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

### Toma y procesamiento de muestras

El cálculo del tamaño de la muestra se determinó mediante la distribución no central de *F* según Martin, [29] y basándose en experimentos anteriores que utilizaron un número de muestras por tratamiento igual [42] y similar [3, 36, 44] a este estudio. El día 42 del experimento se tomaron 8 aves al azar por tratamiento (2 por cada réplica), las cuales se pesaron y separaron. La obtención de sangre se realizó mediante sangría por un corte con bisturí en la región cervical. La sangre se colectó en tubos de ensayo estériles sin anticoagulante y su suero sanguíneo se colocó en nuevos tubos estériles y se congeló hasta su procesamiento, en el laboratorio de Química Sanguínea del Instituto Hematológico de Occidente. La determinación de la actividad enzimática sérica de AST y ALT se realizó con un equipo autoanalizador de bioquímica Sigma Diagnostic 2000.

Posteriormente se realizó el sacrificio por dislocación cervical de las aves seleccionadas para hacer la necropsia y extracción del hígado (8 por tratamiento). La evaluación macroscópica se ejecutó mediante la inspección externa del órgano y el peso relativo del mismo [36]. Se tomaron cortes de cada hígado (8 por tratamiento) para identificar lesiones histopatológicas. Estas se clasificaron de acuerdo al grado de severidad en escala ordinal de la siguiente manera: 0= normal, 1= leve (hepatocitos vacuolados con escasa necrosis y sinusoides obliterados) y 2= moderada (incremento de hepatocitos vacuolados con necrosis moderada y sinusoides obliterados) [36].

### Análisis estadístico

La base de los datos se procesó en el paquete estadístico S.A.S (Statistical Analysis System) v. 8,6. El análisis estadístico de los pesos hepáticos relativos y la actividad enzimática sérica (AST y ALT), se realizó ejecutando la prueba de *t*-student para establecer la diferencia entre los tratamientos y para determinar la diferencia entre tratamientos en las lesiones histopatológicas, se utilizó la prueba de la suma de los rangos de Wilcoxon [9], correspondientes para un diseño completamente al azar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pesos hepáticos relativos

En la TABLA I se presentan las medias de los pesos hepáticos relativos del experimento. Los hígados del tratamiento con 0,07mg de AFB<sub>1</sub>/kg de alimento balanceado (T<sub>2</sub>) no variaron significativamente su peso relativo con respecto al control (T<sub>1</sub>) y no presentaron lesiones macroscópicas, probablemente esto es debido a las bajas concentraciones de AFB<sub>1</sub> ingerida en la dieta, sin embargo, pollos que recibieron dietas con niveles de aflatoxina (0,075 mg/kg) similares a los de este estudio durante 42 días, demostraron un significativo incremento de los lípidos del hígado y consecuentemente del tamaño del mismo [10]. Por otro lado, pollos que ingirieron dietas con menores niveles de aflatoxina (0,05mg/kg) durante el mismo periodo de exposición, no presentaron variación significativa en el peso hepático relativo, así como, ausencia de lesiones macroscópicas [36]. En otro tipo de ensayo, suministraron dosis de aflatoxina B<sub>1</sub> (0,05mg/kg de peso vivo) a pollos durante 21 días y no encontraron variación en el peso relativo del hígado [30].

Otros experimentos en pollos sometidos a mayores concentraciones de aflatoxina en la dieta con respecto a las del presente estudio, no obtuvieron cambios significativos en los pesos hepáticos relativos [31], pero reportan lesiones macroscópicas del órgano [14]. Ensayos que incorporaron varios niveles de aflatoxina en el alimento de pollos de engorde, describen que el incremento de la toxina aumentó el peso relativo de los hígados, comenzando en forma exponencial a partir de los niveles más bajos del ensayo (0,625 y 1,25 mg/kg), para luego tornarse aproximadamente constante a partir de los mayores

niveles de toxina, los autores sugieren que el nivel umbral para el aumento del peso del hígado es muy pequeño [45].

En un estudio de dosis respuesta se determinó que el desarrollo del hígado de pollos de engorde, puede ser selectivamente retardado por niveles de aflatoxina que son demasiado bajos para producir congestión e inflamación hepática [43]. Asimismo otros autores [19], reportan una disminución significativa del peso hepático relativo, lo cual no se esperaban en su ensayo debido a que el incremento en tales pesos está aceptado como un sensible indicador de aflatoxicosis en pollos. Los distintos reportes citados dejan ver un comportamiento aparentemente inconstante del peso hepático relativo, cuando pollos de engorde son sometidos a dietas experimentales con aflatoxina.

### Lesiones histopatológicas del hígado

La TABLA II presenta la frecuencia de las lesiones hepatotóxicas observadas en el estudio histológico de las muestras de este órgano. Al comparar el grupo control (T<sub>1</sub>) con el T<sub>2</sub>, se detectó diferencia estadística (P < 0,01) en la frecuencia de lesiones microscópicas entre ambos tratamientos. En las aves del tratamiento control (T<sub>1</sub>) todas las muestras se observaron normales, mientras que las muestras provenientes de pollos que consumieron alimento contaminado con AFB<sub>1</sub> a 0,07mg/kg (T<sub>2</sub>), el 25% resultaron normales, el 62,5% presentaron hepatopatía tóxica leve (HT-L) y un 12,5% presentó hepatopatía tóxica moderada (HT-M).

En las lesiones HT-L los hepatocitos se observaron hinchados con vacuolas lipídicas e hídricas y núcleos conservados o con escasa necrosis individual de estas células (ausencia de núcleos), en algunos casos se observó un leve incremento del número de agregados linfoides y sinusoides obliterados (FIG. 1). Asimismo, dentro de esta categoría en dos (2) muestras del T<sub>2</sub> se presentaron lesiones características de mitotoxicosis hepática leve, observándose un leve a moderado incremento del número de agregados linfoides, espacios portales engrosados con leve proliferación y dilatación de los conductos biliares con hepatocitos conservados (FIG. 2).

En cuanto a las lesiones HT-M, estas presentaron un mayor número de hepatocitos hinchados con vacuolas lipídicas e hídricas con núcleos conservados y/o necrosis individual de hepatocitos (ausencia de núcleos), acompañado frecuente-

TABLA I  
**PROMEDIOS DE PESOS HEPÁTICOS RELATIVOS DE POLLOS DE ENGORDE QUE RECIBIERON DIETAS SIN O CON AFLATOXINA B<sub>1</sub> DURANTE 42 DÍAS / MEAN RELATIVE LIVER WEIGHT IN BROILER RECEIVING DIET WITHOUT OR WITH AFLATOXIN B<sub>1</sub> DURING 42 DAYS**

| Tratamiento (T) | Aflatoxina B <sub>1</sub><br>(0,07 mg/kg) | Pesos Hepáticos (g/100 g de<br>peso vivo) | EEM    | Número de<br>Observaciones/Tratamiento |
|-----------------|---|---|--------|--|
| T <sub>1</sub>  | -   | 1,85 <sup>ns</sup>                        | ± 0,05 | 8                                      |
| T <sub>2</sub>  | +   | 2,06 <sup>ns</sup>                        | ± 0,12 | 8                                      |

ns = no hay diferencia significativa (P > 0,05). EEM: Error Estándar de la Media.



**TABLA II**  
**FRECUENCIA DE LESIONES HEPATOTÓXICAS EN**  
**POLLOS DE ENGORDE QUE RECIBIERON DIETAS SIN (T<sub>1</sub>)**  
**O CON (T<sub>2</sub>) AFB<sub>1</sub> (0,07 mg/kg) DURANTE 42 DÍAS /**  
**FREQUENCY OF HEPATOTOXIC LESIONS IN BROILER RECEIVING**  
**DIET WITHOUT (T1) OR WITH (T2) AFB<sub>1</sub> (0.07 mg/kg) DURING 42 DAYS**

|                        | Tratamientos (T) |                |
|------------------------|------------------|----------------|
|                        | T <sub>1</sub>   | T <sub>2</sub> |
| Frecuencia normal      | 8/8              | 2/8            |
| Porcentaje             | 100%             | 25%            |
| Frecuencia HT-L        | 0/8              | 5/8            |
| Porcentaje             | 0%               | 62,5%          |
| Frecuencia HT-M        | 0/8              | 1/8            |
| Porcentaje             | 0%               | 12,5%          |
| Total de observaciones | 8                | 8              |

HT-L: Hepatopatía Tóxica, Leve. HT-M: Hepatopatía Tóxica, Moderada.

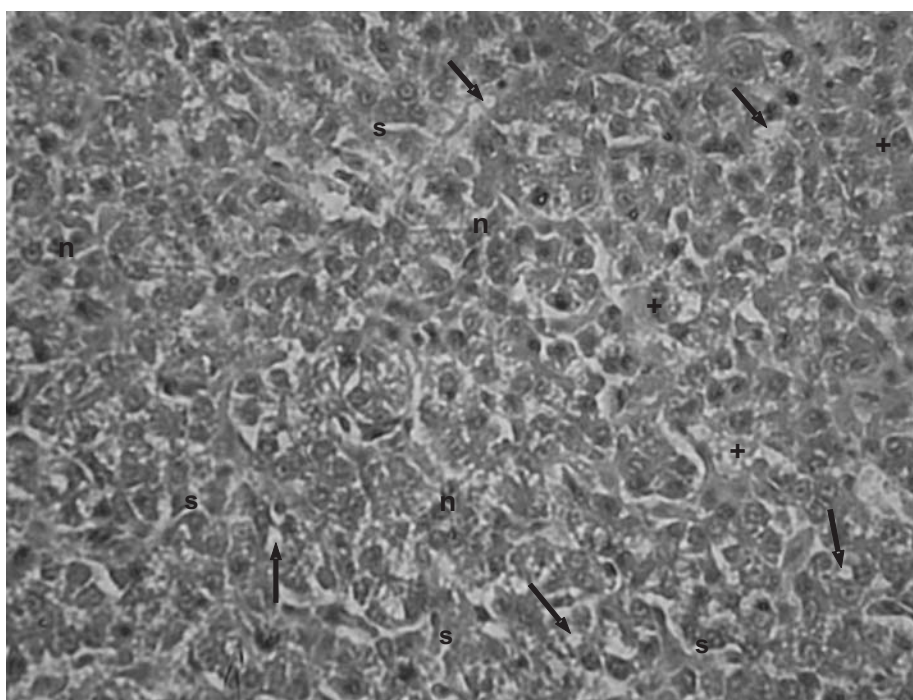
mente de sinusoides obliterados y un leve incremento del número de agregados linfoides en algunos casos (FIG. 3).

Los resultados descritos anteriormente en la histopatología del T<sub>2</sub> indican una significativa frecuencia de lesiones hepatotóxicas de tipo leve y moderada con mínima proliferación y

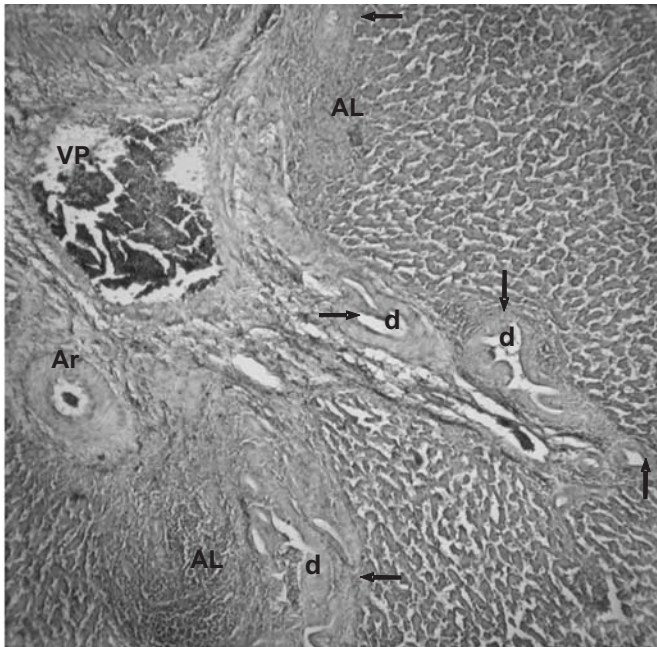
dilatación de los conductos biliares, las cuales seguramente son producto de la ingestión de bajas concentraciones de AFB<sub>1</sub> en la dieta. Estudios con mayores niveles de aflatoxina en el alimento, reportan que las lesiones hepáticas en aflatoxicosis histológicamente se caracterizan por degeneración hidrópica y cambios lipídicos en los hepatocitos, así como hiperplasia de los conductos biliares [8, 11, 23].

Otros autores clasifican las lesiones histopatológicas en hígado producidas por aflatoxinas en agudas y crónicas, describiendo en la aflatoxicosis aguda una amplia degeneración lipídica con vacuolación grasa del citoplasma de los hepatocitos y necrosis, aumento de tamaño de su núcleo, cariomegalia, nucléolos prominentes y rápida proliferación de los conductos biliares. En las intoxicaciones crónicas los hepatocitos se observan basófilos, vacuolados y regenerativos. También hay proliferación de conductos biliares, fibrosis del tejido y células inflamatorias (heterófilos y polimorfonucleares) presentes en zonas portales [40]. La descripción de intoxicación crónica coincide con las hepatopatías tóxicas observadas en el presente estudio.

Otros experimentos [36], evaluaron los efectos de la aflatoxicosis crónicas a los 42 días con menores niveles de aflatoxina en la dieta (0,05 mg/kg) y no encuentran diferencia significativa en la frecuencia de lesiones hepáticas con respecto a su grupo control, pero describen cambios histológicos he-



**FIGURA 1. HÍGADO DE POLLO DE ENGORDE QUE RECIBIÓ DIETA CON AFLATOXINA B<sub>1</sub> (0,07 mg/kg) DURANTE 42 DÍAS. LESIÓN HEPATOTÓXICA LEVE (HT-L). OBSÉRVESE HEPATOCITOS CON NÚCLEOS CONSERVADOS (n), LEVE INCREMENTO DE VACUOLAS LIPÍDICAS Y/O HÍDRICAS (↑), NECROSIS DE HEPATOCITOS CON AUSENCIA DE NÚCLEOS (+), SINUSOIDES OBLITERADOS (s). HEMATOXILINA-EOSINA 680X / LIVER OF BROILER RECEIVING DIET WITH AFLATOXIN B<sub>1</sub> (0.07 mg/kg) DURING 42 DAYS. SLIGHT HEPATOTOXIC LESIONS (HT-L). NOTE HEPATOCYTES WITH NORMAL NUCLEI (N), SLIGHT INCREASE OF LIPID AND/OR HIDRIC VACUOLES (↑), HEPATOCYTES NECROSIS WITHOUT NUCLEI (+), OBLITERATED SINUSOIDS (S). HEMATOXILINE-EOSINE 680X.**



**FIGURA 2. HÍGADO DE POLLO DE ENGORDE QUE RECIBIÓ DIETA CON AFLATOXINA B<sub>1</sub> (0,07 mg/kg) DURANTE 42 DÍAS. LESIÓN HEPATOTÓXICA LEVE (HT-L). OBSÉRVESE LOS ESPACIOS PORTALES ENGROSADOS CON PROLIFERACIÓN DE CONDUCTOS BILIARES (↑), DILATACIÓN DE ALGUNOS DE ELLOS (D), VENA PORTA (VP), RAMA DE LA ARTERIA HEPÁTICA (AR) Y AGREGADOS LINFÓCIDOS (AL). HEMATOXILINA-EOSINA 65X / LIVER OF BROILER RECEIVING DIET WITH AFLATOXIN B<sub>1</sub> (0.07 mg/kg) DURING 42 DAYS. SLIGHT HEPATOTOXIC LESIONS (HT-L). NOTE THICKENING OF PORTAL SPACES WITH BILE DUCTULE PROLIFERATION (↑), AND DILATION (D), PORTAL VEIN (VP), BRANCH OF THE HEPATIC ARTERIE (AR). HEMATOXILINE-EOSINE 65X.**

páticos, tales como, leve degeneración hidrópica y cambios lipídicos en los hepatocitos, con leve proliferación de conductos biliares y fibrosis periportal, asimismo estos autores reportan que pollos que reciben 0,1mg/kg de aflatoxina en la dieta manifestaron lesiones microscópicas significativas con respecto al control, pero con un grado de severidad moderado.

Investigaciones en pollos de engorde expuestos a aflatoxicosis experimentales durante 42 días [10], reportan un significativo incremento del contenido de lípidos en hígados con respecto al control, con niveles de toxina en la dieta similares (0,075 mg de aflatoxina/kg) a las de nuestro estudio. A pesar de que los autores no evaluaron lesiones histopatológicas en este órgano, sus hallazgos apoyan los resultados del presente ensayo, indicando que aún a estas concentraciones de AFB<sub>1</sub> en el alimento puede producirse hepatotoxicidad, lo que explicaría la aparición de lesiones microscópicas en el T<sub>2</sub>.

#### Actividad enzimática en suero (AST y ALT)

Los promedios de actividad enzimática en suero se presentan en la TABLA III. La media de la actividad en suero de la

ALT en el T<sub>2</sub> no presentó diferencia significativa con respecto al valor del T<sub>1</sub>. Otros ensayos [3], no obtienen diferencia significativa en la actividad sérica de la ALT en pollos sometidos a dietas experimentales con aflatoxinas. Por otro lado, la baja actividad relativa de esta enzima en hígado, es motivo para que algunos autores no la consideren tan sensible para detectar alteraciones hepáticas en aves [27].

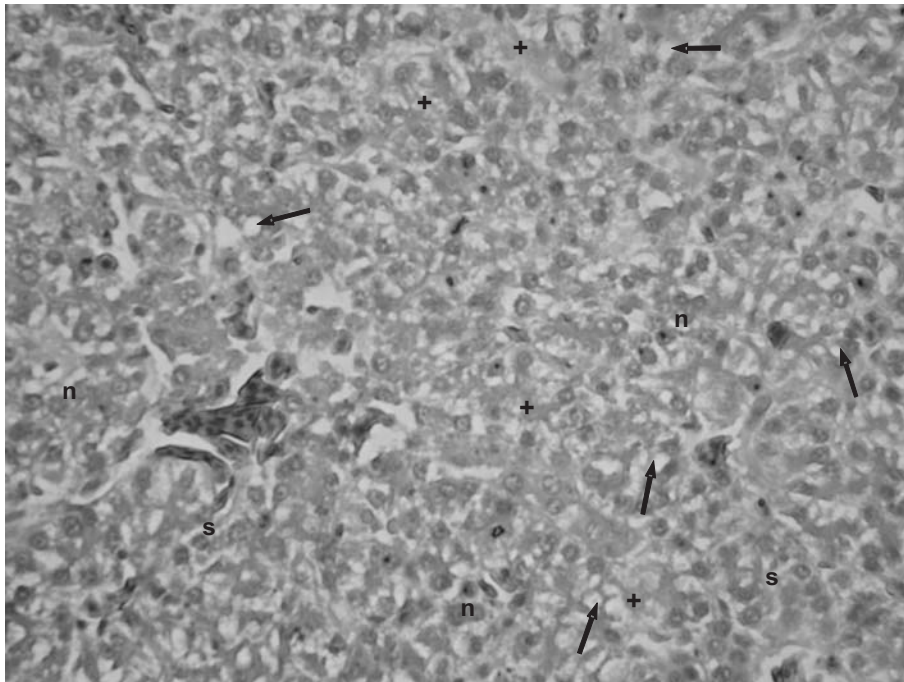
La ingestión de 0,07mg/kg de AFB<sub>1</sub> (T<sub>2</sub>), redujo significativamente ( $P < 0,05$ ) la actividad en suero de la AST con respecto al valor promedio de T<sub>1</sub> (TABLA III). Estudios similares con 0,05mg/kg de aflatoxina en la dieta, reportan resultados semejantes demostrando una disminución significativa de la actividad enzimática de AST en suero en pollos a los 42 días [33]. Otros estudios con mayores concentraciones de aflatoxina (2,5 a 3,5 mg/kg) obtienen resultados similares a los de nuestro ensayo, reportando disminución de la actividad enzimática sérica de AST y asocian estos resultados a la inhibición de la síntesis de proteínas que produce la aflatoxicosis en pollos [20, 24, 25].

No obstante hay que considerar, que las bajas concentraciones de AFB<sub>1</sub> a las que se expusieron las aves durante el periodo experimental (42 días), van a provocar una aflatoxicosis de tipo crónica [10, 33, 35, 36], donde generalmente se ve alterada la síntesis de proteínas [21, 47]. Por lo que, la significativa disminución en la actividad sérica de AST en el T<sub>2</sub>, pudo ser inducida por la alteración de la síntesis de proteínas que causó la ingestión de AFB<sub>1</sub>, considerando la naturaleza proteica de las enzimas [48].

Por otra parte, hay que destacar que ensayos ejecutados simultáneamente con el presente estudio [16], demostraron que las aves del T<sub>2</sub> no presentaron diferencia ( $P > 0,05$ ) con respecto al T<sub>1</sub> en el peso corporal, consumo de alimento, ganancia diaria de peso, conversión y mortalidad a los 42 días, lo que sugiere que las alteraciones hepáticas descritas en estas aves al parecer tuvieron un efecto muy sutil, lo que aparentemente no causó efectos importante en el desempeño de los pollos de engorde.

Al comparar los resultados de la presente investigación con otros experimentos que utilizaron alimento con bajos niveles de aflatoxina se observa, que pollos sometidos a dietas contaminadas con esta toxina (0,06mg /kg) presentaron aflatoxicosis clínica [46], asimismo deficiente conversión de alimento, pobre crecimiento y pigmentación se apreció a concentraciones  $< 0,05$ mg/kg [17], mientras que otros ensayos no detectan variaciones significativas en conversión de alimento, consumo y ganancia de peso, en pollos que recibieron aflatoxina (0,05mg/kg) en la dieta [35]. Estos resultados al parecer indican que existe una relativa contradicción entre los distintos ensayos con pollos expuestos (42 días) a bajos niveles de aflatoxina en dietas experimentales.

Jones y col. [22], señalan que discrepancias como éstas podrían deberse a la interacción que ocurre entre las aflatoxinas y otros factores no deseados (nutrición inadecuada del



**FIGURA 3. HÍGADO DE POLLO DE ENGORDE QUE RECIBIÓ DIETA CON AFLATOXINA B<sub>1</sub> (0,07 mg/kg) DURANTE 42 DÍAS. LESIÓN HEPATOTÓXICA MODERADA (HT-M). OBSÉRVESE HEPATOCITOS CON VACUOLAS LIPÍDICAS Y/O HÍDRICAS (↑), NÚCLEOS CONSERVADOS (N), NECROSIS DE HEPATOCITOS CON AUSENCIA DE NÚCLEOS (+) Y SINUSOIDES OBLITERADOS (s). HEMATOXILINA-EOSINA 680X / LIVER OF BROILER RECEIVING DIET WITH AFLATOXIN B<sub>1</sub> (0,07 mg/kg) DURING 42 DAYS. MODERATE HEPATOTOXIC LESIONS (HT-M). NOTE HEPATOCYTES WITH LIPID AND/OR HÍDRIC VACUOLES (↑), HEPATOCYTES NORMAL NUCLEI (N), HEPATOCYTES NECROSIS WITHOUT NUCLEI (+), OBLITERATED SINUSOIDS (S). HEMATOXILINE-EOSINE 680X.**

**TABLA III**

**PROMEDIOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUERO SANGUÍNEO DE ASPARTATO-AMINOTRANSFERASA (AST) Y ALANINO-AMINOTRANSFERASA (ALT) EN POLLOS DE ENGORDE QUE RECIBIERON DIETAS SIN Y CON AFLATOXINA B<sub>1</sub> DURANTE 42 DÍAS / MEAN ENZIMATIC ACTIVITY IN SERUM OF ASPARTATE-AMINOTRANSFERASA (AST) Y ALANINE-AMINOTRANSFERASE (ALT) IN BROILER RECEIVING DIET WITHOUT OR WITH AFLATOXIN B<sub>1</sub> DURING 42 DAYS**

| Tratamiento (T) | Aflatoxina B <sub>1</sub><br>(0,07mg/kg) | Promedio de Actividad Enzimática (UI/L) |        |                   |        | Nº de observaciones |
|-----------------|--|---|--------|-------------------|--------|---------------------|
|                 |  | AST                                     | EEM    | ALT               | EEM    |                     |
| T <sub>1</sub>  | -  | 241,71 <sup>a</sup>                     | ± 9,95 | 3,38 <sup>a</sup> | ± 0,78 | 8                   |
| T <sub>2</sub>  | +  | 213,66 <sup>b</sup>                     | ± 9,66 | 4,96 <sup>a</sup> | ± 1,92 | 8                   |

EEM: Error Estándar de la Media. <sup>ab</sup>Medias con distinto superíndice dentro de la misma columna difieren estadísticamente (P < 0,05).  
UI/L: Unidades Internacionales/litro.

ave, agentes infecciosos, condiciones ambientales extremas y otras micotoxinas en el alimento) en condiciones de campo, los cuales podrían interactuar directa o indirectamente para causar mayor o menor efecto sobre la salud de las parvadas de pollos de engorde.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A pesar de la ausencia de cambios significativos en el peso hepático relativo y de lesiones macroscópicas, los hallazgos histopatológicos y los resultados de las actividades enzimáticas discutidos anteriormente, indican que aves sometidas a la dieta con 0,07mg de AFB<sub>1</sub>/kg de alimento, presentaron alteraciones hepáticas morfológicas y funcionales a pesar de la

baja concentración de toxina suministrada, evidenciándose una aflatoxicosis crónica.

Los resultados discutidos anteriormente dejan ver, que no existe un nivel seguro de aflatoxina en los alimentos para estas aves de corral, debido a que se presentan factores de riesgo que contribuyen a que los efectos de esta micotoxina, tarde o temprano, alteren la salud de los pollos de engorde, haciéndolos en ocasiones más susceptibles a enfermedades y pudiendo causar pérdidas económicas considerables a la industria avícola. Es recomendable continuar las investigaciones con bajas concentraciones de aflatoxina en la dieta en pollos de engorde, determinando sus efectos bajo condiciones de campo, considerando los factores de riesgo que pueden incrementar su toxicidad.



## AGRADECIMIENTO

Al laboratorio de Química Sanguínea del Instituto Hematológico de Occidente, al laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela y al CONDES.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABDELHAMID, A.M.; DORRA, T.M.; MANSY, S.E.; SALLAM; A.E. Effect of raising dietary protein, amino acids and/or energy levels as an attempt to alleviate severity of the chronic aflatoxicosis by broiler chicks. 2. Biochemical characteristics. **Arch. Tierernahr.** 46(4):347-55. 1994.
- [2] OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (AOAC). In: **Natural Toxins**. M. W. Trucksess, Ed. Chapt. 49. 38-40 pp. 2000.
- [3] BALACHANDRAN, C.; RAMARKRISHNAN, R. Influence of dietary aflatoxin on certain serum enzyme levels in broiler chickens. **Mycopathol.** 101(2):65-7. 1988.
- [4] CAVALHEIRO, A.C.L. Aflatoxinas y Aflatoxicosis: Revisión. **Rev. Avicult.** 27:77-81. 1983.
- [5] CHANG, C.F.; HAMILTON, P.B. Impairment of phagocytosis in chicken monocytes during aflatoxicosis. **Poult. Sci.** 58(3):562-6. 1979.
- [6] CHEN, C.J.; ZHANG, Y.J.; LU, S.N.; SANTELLA, R.M. Aflatoxin B<sub>1</sub> DNA adducts in smeared tumor tissue from patients with hepatocellular carcinoma. **Hepatol.** 16:1150-1155. 1992.
- [7] 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. 1980.
- [8] DAFALLA, R.; YAGI, A.; ADAM, S.E. Experimental aflatoxicosis in hybro-type chicks: sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes. **Vet. Human. Toxicol.** 29(3):222-6. 1987.
- [9] DANIEL, W.W. Estadística no paramétrica y de libre distribución. En: **Bioestadística: Bases para el Análisis de las Ciencias de la Salud**. 5<sup>ta</sup> Ed. Editorial Noriega Editores. 710-736. pp. 1995.
- [10] DOERR, J.A.; HUFF, W.E.; WABECK, C.J.; CHALOUPKA, G.W.; MAY, J.D.; MERKLEY, J.W. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poult. Sci.** 62 (10):1971-7. 1983.
- [11] ESPADA, Y.; DOMINGO, M.; GÓMEZ, J.; CALVO, M.A. Pathological lesions following an experimental intoxication with aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler chickens. **Res. Vet. Sci.** 53:275-279. 1992.
- [12] FAO/OMS. Contaminantes: aflatoxinas. En: **El 49<sup>vo</sup> Informe Técnico del Comité Mixto (FAO/OMS) de Expertos en Aditivos Alimentarios**. OMS-Ginebra. 73-87 pp. 1999.
- [13] FERNÁNDEZ, G.; NEGRÓN, G.; ISEA, G.; SÁNCHEZ, E. Reporte de análisis cuantitativo de aflatoxinas por el método de ELISA en muestras de materias primas de alimento balanceado para aves provenientes de una planta ubicada en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** X (1):63-68. 2000.
- [14] FERNÁNDEZ, A.T.; VERDE, T.; GASCÓN, M.; RAMOS, J.; GÓMEZ, J.; LUCO, D.; CHAVEZ, G. Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chicken fed aflatoxin-containing feed. **Avian Pathol.** 23: 37-47. 1994.
- [15] GIAMBRONE, J.J.; DIENER, U.L.; DAVIS, N.D.; PAN-ANGALA, V.S.; HOERR, F.J. Effects of purified aflatoxin on broiler chickens. **Poult. Sci.** 64 (5):852-8. 1985.
- [16] GÓMEZ, C.C. Influencia del cultivo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*<sub>1026</sub> y selenio sobre la toxicidad de la aflatoxina B<sub>1</sub> en pollos de engorde. Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, División de Postgrado. (Tesis de Maestría) 25-59pp. 2003.
- [17] HAMILTON, P.B. Proof of mycotoxicosis being a field problem and a simple method for their control. **Poult. Sci.** 54:1706-708. 1982.
- [18] HUA, S.S.; BAKER, J.L.; ESPIRITU, M.F. Interactions of saprophytic yeasts with a *nor* mutant *Aspergillus flavus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65(6):2738-3740. 1999.
- [19] HUFF, W.E.; KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; CORRIER, D.E.; MOLLENHAUER, H.H. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. **Poult. Sci.** 65(10):1891-9. 1986.
- [20] HUFF, W.E.; KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; PHILLIPS, T.D. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. **Poult. Sci.** 71(1):64-9. 1992.
- [21] JARAMILLO, M.E. Hongos-Micotoxinas-Nutrientes: Interacciones y Efectos sobre Alimento, Digestión y Metabolismo en Aves. Memorias: **III Curso de Patología Aviar y Patologías Nutricionales y Ambientales**. Postgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela. Maracay, 04-08 de Junio Venezuela. 2-9pp. 2001.
- [22] JONES, F.T.; HAGLER, V.H; HAMILTON, P.B. association of low levels of aflatoxin in feed with productivity losses in commercial broiler operations. **Poult. Sci.** 61:861-68. 1982.
- [23] KIRAN, M.M.; DEMET, O.; ORTATATH, M.; OGUZ, H. The effect of polyvinylpyrrolidone on aflatoxicosis in broilers. **Avian. Path.** 27:250-255. 1998.



- [24] KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; PHILLIPS, T.D.; CLEMENT, B.A. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicates on aflatoxicosis in broiler chicks. **Poult. Sci.** 72(4):651-7. 1993<sup>b</sup>.
- [25] KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; HUFF, W.E.; ELISALDE, M.H.; YERSIN, A.G.; PHILLIPS, T.D.; ROTTINGHAUS, G.E. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. **Poult. Sci.** 72(1):51-9. 1993<sup>a</sup>.
- [26] LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. Aflatoxins. In: **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins**. University Books. Guelph, Ontario, Canada. 249-298 pp. 1995.
- [27] LUMEIJ, J.T. Hepatology. In: B.W. Ritchie; G.J. Harrison; L.L. Harrison (Eds.), **Avian Medicine Principles and Application**. Unabridged Edition, 275-280. pp. 1997.
- [28] MAZZANI, C. Ocurrencia de Hongos Toxigénicos en Cereales con Énfasis en Maíz. Memorias: **I Jornadas Internacionales de Micotoxinas y Micotoxicosis**. Postgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 1-4 de diciembre. 24-26 pp. 2004.
- [29] MARTIN, F.G. **Statistical Design and Analysis**. University of Florida, Copy Center (Ed.) UF. 2-4 a 2-7 pp. 1995.
- [30] MAURICE, D.V.; BODINE, A.B.; REHRER, N.J. Metabolic effects of low aflatoxin B<sub>1</sub> levels on broiler chicks. **Appl. Environ. Microbiol.** 45(3):980-4. 1983.
- [31] MERKLEY, J.W.; MAXWELL, R.J.; PHILLIPS, J.G.; HUFF, W.E. Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. **Poult. Sci.** 69:59-67. 1987.
- [32] NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Poultry**. 9<sup>th</sup> Ed. National Academy Press, Washington D.C. 11-15pp.1994.
- [33] OGUZ, H.; KURTOGLU, F.; KURTOGLU, V.; BIRDANE, Y.O. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Res. Vet. Sci.** 73(1):101-3. 2002.
- [34] OGUZ, H.; KURTOGLU, V. Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. **Br. Poult. Sci.** 41:512-517. 2000.
- [35] OGUZ, H.; KURTOGLU, V.; COSKUN, B. Preventive efficacy of clinoptilolite in broiler during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) exposure. **Res. Vet. Sci.** 69(1):197-201. 2000.
- [36] ORTATATLI, M.; OGUZ, H.; HATIPOGLU, F.; KARAMAN, M. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Res. Vet. Sci.** 78(1):61-8. 2005.
- [37] OSUNA, O. Interacción de Algunos Tóxicos con Aminoácidos del Alimento. En: **Compendio Sobre Micotoxinas**. Latox Ltda. Ed. Bogota, Colombia. 5-14 pp. 1996.
- [38] OSUNA, O. Micotoxinas: Problemas de Salud Pública, Efectos en Aves, Métodos de Análisis y Nuevos Tratamientos. Memorias de: **Seminario de Actualización, Nutrición y Patologías Asociadas a Nutrición en Aves**. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. 4-5/11, Bogotá, Colombia 2-11pp. 1991.
- [39] 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. Científ. FCV-LUZ**. XI (4):337-341. 2001.
- [40] RIDDELL, C. Liver. In: **Avian Histopathology**. 1<sup>ra</sup> Ed. Western College of Veterinary Medicine University of Saskatchewan. 57-66 pp. 1984.
- [41] ROSA, C.A.; MIAZZO, R.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; CHIACCHIERA, S.M.; FERRERO, S.; SAENZ, M.; CARVALHO, E.C.; DALCERO, A. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. **Poult. Sci.** 80(2):139-44. 2001.
- [42] SANTURIO, J.M.; MALLMANN, C.A.; ROSA, A.P.; APPEL, G.; HEER, A.; DAGEFORDE, S.; BOTTCHEER, M. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. **Br. Poult. Sci.** 40(1):115-119. 1999.
- [43] SCHROEDER, E. C.; NAIR, K. P.; CARDEILHAC, P. T. Response of broiler chicks to a single dose of aflatoxin. **Poult. Sci.** 51(5):1552-6. 1972.
- [44] SHUKLA, S.K.; PACHAURI, S.P. Blood biochemical profiles in induced aflatoxicosis of cockerels. **Br. Poult. Sci.** 36(1):155-60. 1995.
- [45] SMITH, J.W.; HAMILTON, P.B. Aflatoxicosis in the broiler chicken. **Poult. Sci.** 49(1):207-215. 1970.
- [46] SMITH, R.B.; GRIFFIN, J.M.; HAMILTON, P.B. Survey of aflatoxicosis in farm animals. **Appl. and Environ. Microbiol.** 31(3):385-388. 1976.
- [47] VAAMONDE, G. Micotoxinas. En: A.A. Silvestre (Ed.), **Toxicología de los Alimentos**. 2<sup>a</sup> Ed. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 153-193 pp. 1996.
- [48] VOIGT, M.N.; TYE, T.M.; PARK, L.E.; WRIGHT, J.M.; HALL, D.E. Influence of avian aflatoxicosis on the synthesis of polyamines. **Poult. Sci.** 66:1217-1223. 1987.
- [49] YANG, C.F.; LIU, J.; WASSER, S.; SHEN, H.M.; TAN, C.E.; ONG, C.N. Inhibition of ebselen on aflatoxin B(1)-induced hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats. **Carcinogen.** 21(12):2237-2243. 2000.