

EVALUACIÓN DE DOS ADSORBENTES (MANANO OLIGOSACÁRIDOS Y CLINOPTILOLITA) EN DIETAS DE POLLOS DE ENGORDE CONTAMINADAS CON FUMONISINA B₁

Patricia Landeros*, Waldina P. Reyes*, E. de Lucas*, Esther Albarrán*, Yolanda López* y Teóduo Quezada**

*Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. KM. 15.5 Carretera GDL-Nogales, Las Agujas, Zapopan; Jalisco, México. CP 45110. Correo electrónico: plander@cucba.udg.mx; **Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Clínica Veterinaria, Jesús María, Aguascalientes, S/N.

RESUMEN: Las fumonisinas son micotoxinas producidas principalmente por *Fusarium verticillioides*, que contaminan el maíz y el sorgo y, por lo tanto, representan un riesgo para la salud animal. Con el propósito de evaluar la eficiencia de dos adsorbentes de micotoxinas en dietas de pollos de engorde contaminadas experimentalmente con fumonisina B₁ (FB₁), se seleccionaron 162 pollos de engorde Ross machos de 1 día de edad, de 44 ± 1.2 g de peso promedio, distribuidos aleatoriamente en 9 tratamientos que incluyeron dos adsorbentes (clinoptilolita al 2.5% y manano oligosacáridos al 2.0 %) y dos niveles de FB₁ (75 y 100 ppm). Se evaluaron los parámetros productivos y se determinó la actividad enzimática de aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), proteínas totales, esfinganina (SA) y esfingosina (SO) en suero; proteínas totales y glutatión reducido (GSH) en tejido hepático y renal, además del estudio histopatológico. Los datos fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) y Tukey. Se observó aumento significativo de la actividad enzimática de AST y en la relación SA/SO en los grupos expuestos a FB₁ (P<0.05). El estudio histopatológico mostró daño tisular moderado. Se puede concluir que los niveles evaluados de fumonisinas inician el daño a nivel celular, detectado por la alteración de la relación SA/SO, sin que se aprecien efectos toxicológicos severos en órganos, por lo que se reafirma que la relación es un biomarcador sensible de exposición a FB₁ en pollos de engorde, mientras que los dos adsorbentes bajo las condiciones experimentales utilizadas, mostraron un leve efecto protector similar sobre los pollos de engorde.

(Palabras clave: fumonisina B₁; biomarcadores; clinoptilolita; manano oligosacáridos; pollos)

EVALUATION OF TWO ADSORBENTS (MANNAN OLIGOSSACHARIDES AND CLINOPTILOLITE) IN DIETS OF BROILERS CONTAMINATED WITH FUMONISIN B₁

ABSTRACT: Fumonisins are micotoxins mainly produced by *Fusarium verticillioides*, which usually contaminate corn and sorghum grains representing a serious animal health risk. Two fumonisin adsorbents were assayed in broiler diets experimentally contaminated with fumonisin B₁ (FB₁). To this aim, 162 Ross male chicken average weight 44 ± 1.2 g were randomly distributed into 9 groups including two adsorbents (mannan- oligossacharides and clinoptilolite) and two FB₁ levels (75 and 100 ppm). The productive parameters, as well as the enzymatic activities of aspartate amine transferase (AST) and alanine amine transferase (ALT), total proteins, sphinganine (SA) and sphingosine (SO) and their ratio (SA/SO) in serum and reduced glutathione (GSH) were tested in hepatic and renal tissues. A parallel histopathologic study was conducted. Statistical analysis was conducted by variance analysis (ANOVA) and Tukey's test. There was a significant increase of AST enzymatic activity, as well as in SA/SO relationship in the groups exposed to FB₁ (p<0.05). The histopathological study showed a moderate tissue damage. It can be concluded that the fumonisin levels evaluated begin the damage at cellular level and detected by the alteration of the ratio SA/SO, without the observation of severe toxicological effects in organs, so it can be confirmed that the ratio is a sensitive biomarker of exhibition to FB₁ in chickens, while the two adsorbents under the experimental conditions used, showed a slight similar protective effect on the chickens.

(Key words: fumonisin B₁; biomarker; clinoptilolite; mannan-oligossacharides; adsorbents; broilers)

INTRODUCCIÓN

Los efectos tóxicos de la contaminación de maíz con *F. verticillioides* y fumonisinas (FBs) en los animales y los posibles efectos en humanos han sido estudiados ampliamente en todo el mundo. Las enfermedades asociadas con el consumo de alimentos contaminados con fumonisinas incluyen lesiones en cerebro en equinos, edema pulmonar en cerdos; nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y carcinoma hepatocelular en ratas de laboratorio. (7) En aves los efectos toxicológicos se caracterizan por decremento del consumo de alimento y en la ganancia de peso, elevada actividad enzimática en suero, incremento de peso del hígado y riñón, necrosis hepática y raquitismo (24).

El riesgo potencial a la salud en humanos y animales expuestos a FBs puede estudiarse mediante biomarcadores presentes en orina, suero y tejidos, que asocian la exposición con la alteración del organismo. Estos estudios indican que la enzima clave del metabolismo de los esfingolípidos (N-aciltransferasa de esfinganina) es el blanco celular de la toxicidad y carcinogenicidad de las fumonisinas, dicha alteración incrementa la relación de los precursores esfinganina (SA) y esfingosina (SO), los cuales son detectados en suero y orina previamente al daño en tejidos (20). Estudios realizados en cerdos, equinos y aves, demostraron que la relación SA/SO es un excelente biomarcador específico de daño por la toxicidad de la FB₁ (7).

Entre las estrategias para controlar la contaminación por micotoxinas destaca el uso de adsorbentes o ligantes, tal es el caso de las arcillas y los aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados (HSCAS), y más recientemente los de origen natural como los manano oligosacáridos, derivados de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (15).

El uso de adsorbentes de micotoxinas incorporados a los alimentos balanceados para aves, podría reducir la exposición a fumonisinas, además del empleo de biomarcadores adecuados para medir dicha exposición antes de la manifestación de lesiones en tejidos, por lo que el objetivo del presente estudio fue valorar el uso de dos adsorbentes: la clinoptilolita y un manano-oligosacárido, en dietas contaminadas con fumonisinas sobre los parámetros productivos de los pollos de engorde, las actividades enzimáticas de la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanino-aminotransferasa (ALT), proteínas totales séricas (PT) y las concentraciones de glutatión reducido (GSH) en tejidos hepáticos y renales como indicadores de los efectos tóxicos a la exposición de la FB₁ en pollos de

engorde, así como, el uso de la relación SA/SO como biomarcador del daño tóxico producido por la exposición a la FB₁ con y sin adsorbentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, en colaboración con el Departamento de Clínica Veterinaria del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes y el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas Físicoquímicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, en Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Se procedió a contaminar maíz con la cepa de *Fusarium verticillioides* M7075, alta productora de FB₁, y al término de un mes de incubación se cuantificaron los niveles alcanzados mediante cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC) descrita por Doko *et al.*, (6) en un sistema Hewlett Packard 1100 con detector de fluorescencia HP 104 A e integrador.

Pollos:

Se emplearon 162 pollos de engorde machos, Ross, de un día de edad y 44 ± 1.2 g de peso promedio. El experimento se realizó con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3X3 (factor A; 2 adsorbentes y el factor B; 3 niveles de fumonisina B₁: 0, 75 y 100 ppm).

Las aves se distribuyeron aleatoriamente en 9 tratamientos con 3 repeticiones de 6 pollos cada uno, según el diseño mostrado en la Tabla 1.

TABLA 1. Diseño experimental de los grupos de tratamiento./ *Experimental design of the treatment groups*

Grupo	Tipo de tratamiento
T ₁	Control negativo
T ₂	75 ppm de FB ₁
T ₃	100 ppm de FB ₁
T ₄	2.5% clinoptilolita
T ₅	75 ppm de FB ₁ + 2.5% clinoptilolita
T ₆	100 ppm de FB ₁ + 2.5% clinoptilolita
T ₇	2.0 % manano oligosacáridos
T ₈	75 ppm de FB ₁ + 2.0 % manano oligosacáridos
T ₉	100 ppm de FB ₁ + 2.0 % manano oligosacáridos

Los pollos fueron alimentados en dos etapas: la de iniciación (0 a 4 semanas) y la de finalización (5 a 7 semanas), las dietas fueron isoproteicas e isoenergéticas. En los grupos que contenían FB₁ se incluyó el maíz contaminado sustituyendo el sorgo en la dieta basal. Las aves se mantuvieron con agua y alimento a voluntad en condiciones normales. A los 14 días de edad, se expusieron al alimento contaminado con FB₁ y la adición de los adsorbentes con respecto a su asignación del tratamiento, con una duración de siete días. A partir de los 22 días de edad de los pollos y hasta los 42 días de edad se reestableció la alimentación normal.

Una vez preparadas las dietas de los diferentes tratamientos, se procedió a determinar los niveles de micotoxinas (FBs, AFs y OAs) con la finalidad de descartar posibles interferencias experimentales, mediante inmunoensayo enzimático, procedimiento recomendado por RomerLab® (AgraQuant), y se realizó el análisis proximal de las raciones mediante las técnicas descritas por la AOAC (2).

Como indicadores de respuesta productiva, se consideraron las fórmulas propuestas por Quintana,(13): peso promedio (PP), ganancia diaria de peso (GDP) e índice de conversión (IC). A los 0 y a los 7 y 21 días post-exposición a la FB₁ y adsorbentes (14, 21 y 42 días de edad de las aves respectivamente) se seleccionaron al azar tres pollos por tratamiento los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical. Antes del sacrificio se recolectaron 3 mL de sangre, se centrifugó a 275 g durante 10 min, se obtuvo el plasma y se almacenó a -20°C hasta su análisis. Igualmente se analizaron muestras de hígado y riñón, para la determinación de proteínas por el método de Peterson (12), así como GSH por el método de Hissin y Hilf (9) e histopatología. En plasma se estudiaron las actividades enzimáticas de AST y ALT por la técnicas descritas por Schiele (17); proteínas totales plasmáticas de acuerdo con la técnica de Tietz (22) y la SA y SO por la técnica descrita por Castegnaro *et al.* (5).

Los datos experimentales fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA), empleando el paquete estadístico SAS (1996)(16) y para establecer las diferencias estadísticamente significativas entre medias se utilizó el método Tukey's.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de contaminación natural de los ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas experimentales por aflatoxinas (AFs) y ocratoxinas (OTA) fueron de 3.2 mg/kg (control) a 6.0 mg/kg (T₉), y de

ocratoxinas (OTA) de 1.5 mg/kg (control) a 3.1 mg/kg (T₉), valores que se encuentran dentro de los límites permisibles de estas micotoxinas en alimento destinados para la alimentación de las aves (20 mg/kg para AFs y de 3 a 5 mg/kg para OTA) Por lo tanto, estos niveles de micotoxinas encontrados no influyeron directamente ni de manera sinérgica en la manifestación de los efectos tóxicos observados en los pollos de engorde.

En la Tabla 2 se presentan los efectos de los tratamientos sobre las variables peso promedio (PP), ganancia diaria de peso (GDP) e índice de conversión (IC) a los 42 días de edad, término del experimento. El PP de las aves al término de la prueba no mostró diferencias estadísticas en los factores principales del diseño (P>0.05). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en sus interacciones (P<0.05), donde el PP en los pollos del tratamiento 7 (2.0 % de manano oligosacáridos) fue el mejor con un promedio de 2.18±0.08 kg, mientras que los peores tratamientos fueron el uno (sin FB₁ y sin adsorbente) con un promedio de 1.94±0.12 kg y el tratamiento 8 (75 ppm de FB₁ + 2.0% de manano oligosacárido) con un promedio de 1.91±0.06 kg. Estos resultados podrían estar asociados a la característica de promotor de crecimiento que se le atribuye a *Saccharomyces cerevisiae* (11).

TABLA 2. Efectos de los adsorbentes y del nivel de FB₁ en las dietas sobre los parámetros productivos./ *Effects of the adsorbents and FB₁ level on the productive parameters*

T	Peso Promedio (kg)	Ganancia Diaria de Peso (g)	Índice de Conversión
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
T ₁	1.94 ± 0.12 ^b	45.27 ± 3.04 ^b	1.81 ± 0.08 ^{ab}
T ₂	1.99 ± 0.01 ^{ab}	46.38 ± 0.18 ^{ab}	1.77 ± 0.01 ^{ab}
T ₃	1.96 ± 0.02 ^{ab}	45.80 ± 0.55 ^{ab}	1.92 ± 0.01 ^a
T ₄	1.98 ± 0.07 ^{ab}	46.17 ± 1.79 ^{ab}	1.84 ± 0.07 ^{ab}
T ₅	1.99 ± 0.04 ^{ab}	46.44 ± 1.07 ^{ab}	1.76 ± 0.04 ^{ab}
T ₆	2.05 ± 0.06 ^{ab}	47.85 ± 1.58 ^{ab}	1.74 ± 0.07 ^b
T ₇	2.18 ± 0.08 ^a	50.96 ± 2.03 ^a	1.68 ± 0.02 ^b
T ₈	1.91 ± 0.06 ^b	44.32 ± 1.53 ^b	1.81 ± 0.04 ^{ab}
T ₉	2.07 ± 0.02 ^{ab}	48.27 ± 0.53 ^{ab}	1.76 ± 0.04 ^{ab}

Letras iguales no son significativas para p<0.05

En la ganancia diaria de peso (GDP) de las aves al término de la prueba no mostraron diferencias significativas en los factores principales del diseño (P>0.05).

Sin embargo, si se encontró diferencias estadísticas en las interacciones ($P < 0.05$), donde la GDP para los pollos del tratamiento 7 (2.0 % de manano oligosacáridos) fue el mejor con un promedio de 50.96 ± 2.03 g/día, mientras que los peores tratamientos fueron el tratamiento uno (sin FB_1 y sin adsorbente) con un promedio de 45.27 ± 3.04 g/día y el tratamiento 8 (75 mg de FB_1 /kg de alimento + 2.0% de manano oligosacáridos) con un promedio de 44.32 ± 1.53 g/día, estos resultados presentan una relación directa con los obtenidos en el PP. Estos resultados podrían ser atribuidos a la característica de promotor de crecimiento que se le atribuye a *Saccharomyces cerevisiae* (11).

Por otra parte, en el IC no se logró obtener diferencias significativas en los factores principales del diseño ($P > 0.05$); pero sí en las interacciones de los factores, donde el valor más alto observado fue en las aves que recibieron el tratamiento 3 (1.92 ± 0.01 kg de alimento/kg de carne), mientras que los valores más bajos se obtuvieron de los tratamientos 6 y 7 (1.74 ± 0.07 y 1.68 ± 0.02 kg de alimento/kg de carne, respectivamente) ($P < 0.05$). Estos resultados fueron parcialmente diferentes a los reportados en estudios previos realizados por Weibking *et al.* (24) quienes reportaron que los pollos mostraron una disminución ligera en los parámetros productivos de las aves cuando los niveles de contaminación por FB_1 en el alimento fueron de 75 ppm, y se tornaron severos cuando los niveles superaron los 450 ppm de FB_1 ; por lo que se considera que los niveles de 75 y 100 ppm de FB_1 utilizados y el tiempo de exposición a los que se so-

metieron las aves en este estudio no fueron suficientes para provocar efectos severos sobre el peso promedio final de las aves.

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de proteínas determinadas en tejido hepático y renal. En hígado, a los 7 días post-exposición a la FB_1 no se encontraron diferencias estadísticas en el contenido de proteínas en los factores principales e interacciones del diseño ($P > 0.05$) En el tratamiento 2 se observó el valor más alto con un $18.77 \pm 0.58\%$ y los tratamientos 5 y 8 fueron los que presentaron los porcentajes más bajos (16.63 ± 0.95 y $15.72 \pm 2.26\%$ respectivamente); mientras que, a los 21 días post-exposición hubo diferencia estadística en el factor principal B (75 ppm de FB_1) y en las interacciones del diseño ($P < 0.05$). El grupo de aves del tratamiento 5 (75 ppm de FB_1 + 2.5 % de clinoptilolita) mostró el porcentaje más alto ($18.79 \pm 0.89\%$), mientras que los tratamientos 7 y 4 presentaron las concentraciones de proteínas más bajas (14.36 ± 0.78 y $14.04 \pm 0.93\%$ respectivamente). Ambos tratamientos incluyeron clinoptilolita, adsorbente del grupo de los tectosilicatos que ha sido poco utilizado en las raciones como adsorbente de micotoxinas, los resultados demuestran inconsistencia por lo que deberían realizarse nuevos estudios para conocer sus efectos biológicos en pollos.

Respecto a las concentraciones de proteínas en tejido renal, no se encontraron diferencias estadísticas en ambos tiempos de post-exposición y factores del diseño ($P > 0.05$). Sin embargo, sí se observó una diferencia significativa en las interacciones del dise-

TABLA 3. Concentración de proteínas en tejido hepático y renal./ *Protein concentrations in kidney and liver*

T	Proteínas (mg/100 mg de tejido)			
	Hígado		Riñón	
	Día 7 Post- exposición	Día 21 Post- exposición	Día 7 Post- exposición	Día 21 Post- exposición
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
T ₁	16.66 ± 0.64^a	15.07 ± 1.54^{bcd}	14.89 ± 0.72^{ab}	15.87 ± 1.02^{ab}
T ₂	18.77 ± 0.58^a	17.44 ± 0.84^{abc}	13.60 ± 0.96^{ab}	16.60 ± 2.10^a
T ₃	16.68 ± 0.32^a	16.75 ± 0.79^{abcd}	15.14 ± 0.85^a	14.53 ± 0.36^{ab}
T ₄	16.89 ± 0.48^a	14.04 ± 0.93^d	14.46 ± 1.14^{ab}	16.10 ± 1.16^{ab}
T ₅	16.63 ± 0.95^a	18.79 ± 0.89^a	14.81 ± 1.14^{ab}	16.02 ± 0.96^{ab}
T ₆	18.61 ± 0.78^a	14.95 ± 0.06^{bcd}	11.79 ± 0.48^b	16.10 ± 0.92^{ab}
T ₇	17.55 ± 0.61^a	14.36 ± 0.78^{cd}	13.40 ± 1.58^{ab}	15.82 ± 0.76^{ab}
T ₈	15.72 ± 2.25^a	17.59 ± 0.53^{ab}	15.21 ± 0.72^a	12.60 ± 1.40^b
T ₉	16.89 ± 1.68^a	15.36 ± 1.36^{bcd}	15.68 ± 0.91^a	14.81 ± 0.67^{ab}

Letras iguales son no significativas a una $p < 0.05$

ño en ambos tiempos post-exposición ($P < 0.05$). A los 7 días se observó en el tratamiento 9 la concentración más elevada ($15.68 \pm 0.91\%$), mientras que los tratamientos 6 y 7 presentaron los valores de proteína más bajos (11.79 ± 0.48 y $13.40 \pm 1.58\%$ respectivamente). Por otra parte, a los 21 días post-exposición se muestra que el tratamiento 2 presentó los porcentajes de proteínas más altos ($16.60 \pm 2.10\%$), mientras que los tratamientos 3 y 8 (14.53 ± 0.36 y $12.60 \pm 1.40\%$) fueron los más bajos.

Con respecto a la concentración de GSH reducido en tejidos hepático y renal (Tabla 4), en el tejido hepático se observaron diferencias estadísticas a los 7 días post-tratamiento en el factor principal A (con o sin adsorbentes) y en las interacciones ($P < 0.05$), donde se caracterizó por las concentraciones de GSH en las aves, las cuales no recibieron ningún tipo de adsorbentes mostraron los valores más altos ($94.35 \pm 4.52 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido), mientras que los valores más bajos ($64.66 \pm 2.32 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido) fueron observados en los animales que recibieron el 2.0 % de los manano oligosacáridos en la dieta. Por otra parte, las concentraciones de GSH a los 21 días post-exposición se comportaron de manera diferente siendo estadísticamente diferente en el factor principal B (niveles de FB_1) y en las interacciones del diseño ($P < 0.05$), donde se caracterizó porque las concentraciones de GSH en las aves que recibieron el nivel de 75 ppm de FB_1 mostraron los valores más altos ($138.97 \pm 5.66 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido), mientras que los valores más bajos ($45.93 \pm 9.26 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido) fueron observados en los animales que recibieron 0 ppm

de FB_1 en la dieta. El resultado de las interacciones nos muestra que el tratamiento 6 resultó ser el que tenía una mayor concentración del GSH ($148.12 \pm 7.56 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido) y los tratamientos 4 y 7 tuvieron las concentraciones de GSH más bajas (39.41 ± 9.37 y $43.06 \pm 7.10 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido).

En tejido renal a los 7 días post-exposición no se observó diferencia estadística en el factor principal B del diseño ($P > 0.05$), donde los valores de GSH más altos fueron a dosis de 0 ppm de FB_1 ($9.28 \pm 1.93 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido) y las concentraciones más bajas cuando se administró la dosis de 100 ppm de FB_1 y 2.5% de clinoptilolita ($3.87 \pm 0.80 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido); mientras que a los 21 días de post-exposición se observaron diferencias estadísticas en el factor principal B y en las interacciones del diseño ($P < 0.05$), donde los valores de GSH más altos fueron cuando los pollos recibieron dosis de 100 ppm de FB_1 ($4.50 \pm 0.78 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido) y las concentraciones más bajas cuando se administró la dosis de 0 ppm de FB_1 ($1.91 \pm 0.54 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido). Por otra parte, los resultados de las interacciones nos muestra que el tratamiento 3 resultó ser el que tenía una mayor concentración del GSH ($5.99 \pm 2.24 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido) y los tratamientos 1 y 4 tuvieron los valores de GSH más bajos (0.81 ± 0.57 y $1.03 \pm 0.41 \mu\text{g}$ de GSH/g de tejido). Estos resultados pudieran deberse a la importancia que tiene este compuesto endógeno celular en el proceso de detoxificación celular mediante la conjugación del GSH con los radicales libres producidos por la activación de la micotoxina incrementando con ello la síntesis de este compues-

TABLA 4. Concentración de glutatión reducido en hígado y riñón de pollos./ *Glutathion concentrations reduced in liver and kidney*

T	Glutatión Reducido ($\mu\text{g}/\text{g}$ de tejido)			
	Hígado		Riñón	
	Día 7 Post- exposición	Día 21 Post- exposición	Día 7 Post- exposición	Día 21 Post- exposición
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
T ₁	82.08 ± 2.16^{ab}	45.93 ± 9.26^c	9.28 ± 1.93^a	0.81 ± 0.57^d
T ₂	68.68 ± 7.46^b	131.85 ± 19.32^{ab}	5.49 ± 0.47^a	3.39 ± 0.29^{abcd}
T ₃	94.35 ± 4.52^a	145.06 ± 6.95^a	4.62 ± 0.78^a	5.99 ± 2.24^a
T ₄	69.43 ± 3.86^b	39.41 ± 9.37^c	6.09 ± 0.91^a	1.03 ± 0.41^{cd}
T ₅	76.17 ± 6.55^b	138.97 ± 5.66^{ab}	5.14 ± 0.59^a	5.07 ± 0.64^{ab}
T ₆	65.41 ± 5.83^b	148.12 ± 7.56^a	3.87 ± 0.80^a	3.51 ± 0.55^{abcd}
T ₇	64.66 ± 2.32^b	43.06 ± 7.10^c	8.65 ± 4.58^a	3.89 ± 0.25^{abc}
T ₈	72.10 ± 6.59^b	145.30 ± 5.27^a	4.71 ± 1.03^a	2.20 ± 0.45^{bcd}
T ₉	64.73 ± 8.23^b	103.55 ± 25.91^b	4.02 ± 0.20^a	4.00 ± 0.53^{ab}

Letras iguales son no significativas a una $p < 0.05$

to de defensa. La alteración de los niveles de GSH han sido reportados por Beers *et al.* (4) quien encontró incremento en la concentración de GSH en hígado de pollos de engorde como consecuencia de la ingestión de micotoxinas como la aflatoxina B₁.

Respecto a los efectos observados sobre la actividad enzimática de AST (Tabla 5) se pudo apreciar que a los 7 días post-exposición a la FB₁ hubo un efecto significativo con una mayor actividad enzimática de la AST de 144.44±23.51 U/L en el factor principal B con niveles de 75 ppm de FB₁, con respecto al tratamiento con el nivel de 0 ppm de FB₁, que fue de 101.11±27.58 U/L (P<0.05). Por otra parte, se logró observar en las interacciones de los factores del diseño con diferencias significativas entre los tratamientos 2, 1 y 7 (P<0.05). La mayor actividad de la AST fue para el tratamiento 2 con 150.0±20.81 U/L con relación a las actividades enzimáticas menores observadas en los tratamientos 1 y 7 (90.0±15.27 y 83.3±6.66 U/L respectivamente). Por otro lado, la actividad enzimática de la AST a los 21 días no se observó diferencias significativas en los factores principales del diseño (P>0.05). Sin embargo, sí se logró observar diferencias significativas en las interacciones de los tratamientos 7, 3 y 9 (P<0.05), la mayor actividad enzimática encontrada fue en el tratamiento 7 con 276.7±106.82 U/L con respecto a las menores actividades enzimáticas observadas en los tratamientos 3 y 9 (133.3±8.81 y 133.3±13.3 U/L respectivamente). Estos cambios pueden ser atribuidos a que la FB₁ provoca un efecto de consumo de la enzima AST como resultado del proceso de detoxificación y posterior-

mente un efecto de estímulo en la actividad de la AST para mantener el mismo proceso de detoxificación o presencia del daño tisular. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Ledoux *et al.* (10) que recibieron la FB₁ en el alimento.

La actividad enzimática de la ALT tuvo un comportamiento diferente a la observada en la AST, ya que no se logró observar una diferencia significativa (P>0.05) ni en los factores principales del diseño, ni entre las interacciones de los tratamientos a los 7 y 21 días post-exposición a la FB₁. Sin embargo, sí se observó una tendencia a que los tratamientos con presencia de FB₁ a los 7 días la actividad enzimática fue mayor (T₈: 36.6±16.06 U/L) con respecto a los tratamientos control y con adsorbentes (clinoptilolita y manano-oligosacáridos) donde las actividades enzimáticas de la ALT fueron menores (T₁: 20.0±5.77, T₄: 26.6±12.01 y T₇: 26.6±3.33 U/L); mientras que la tendencia a los 21 días post-exposición fue que los tratamientos que recibieron los adsorbentes tuvieron una mayor actividad enzimática de la ALT, con respecto a los que recibieron FB₁ en la dieta (T₄: 43.3±14.52, T₆: 13.3±3.33 y T₉: 13.3±3.33 U/L).

En cuanto a la concentración de PT plasmáticas, no se observó diferencia estadística significativa a los 7 días post-exposición para el factor A (P>0.05), pero sí para el factor principal B (niveles de FB₁) y la interacción de los factores del diseño (P<0.05). El rango de los valores observados para el factor B fue de 2.15 a 3.18 g de proteína/100 mL de plasma, siendo los tratamientos expuestos a la FB₁ con niveles de 75

TABLA 5. Actividades enzimáticas de la AST y ALT y concentración de proteínas totales plasmáticas de los pollos./ *Enzymatic activities AST and ALT and total proteins in serum*

T	AST U/L		ALT U/L		Proteínas Totales g/dL	
	Día 7 Post-exposición	Día 21 Post-exposición	Día 7 Post-exposición	Día 21 Post-exposición	Día 7 Post-exposición	Día 21 Post-exposición
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
T ₁	90.0±15.2 ^b	136.7±17.6 ^b	20.0±5.7 ^a	20.0±0.0 ^a	3.13±0.24 ^a	2.81±0.32 ^b
T ₂	150.0±20.8 ^a	200.0±40.4 ^{ab}	26.6±8.8 ^a	23.3±3.33 ^a	2.36±0.22 ^{bcd}	3.21±0.26 ^{ab}
T ₃	133.3±8.8 ^a	133.3±8.8 ^b	26.6±3.3 ^a	13.3±3.33 ^a	2.17±0.16 ^{cd}	3.57±0.40 ^{ab}
T ₄	130.0±10.0 ^a	193.3±31.7 ^{ab}	26.6±12.0 ^a	43.3±14.5 ^a	2.90±0.11 ^{ab}	2.73±0.34 ^b
T ₅	133.3±13.3 ^a	156.7±12.0 ^{ab}	26.6±3.3 ^a	13.3±3.3 ^a	1.90±0.23 ^d	2.91±0.61 ^{ab}
T ₆	133.3±8.8 ^a	150.0±17.3 ^{ab}	26.6±3.3 ^a	13.3±3.3 ^a	2.86±0.08 ^{abc}	3.06±0.08 ^{ab}
T ₇	83.3±6.6 ^b	276.7±106.8 ^a	26.6±3.3 ^a	26.7±6.6 ^a	3.50±0.20 ^a	4.01±0.15 ^a
T ₈	150.0±5.7 ^a	170.0±20.8 ^{ab}	36.6±16.0 ^a	43.3±23.3 ^a	2.20±0.32 ^{cd}	2.63±0.21 ^b
T ₉	136.7±3.3 ^a	133.3±13.3 ^b	30.0±0.0 ^a	23.3±3.3 ^a	2.41±0.22 ^{bcd}	2.76±0.37 ^b

Letras iguales no son significativas a una p<0.05

T: tratamiento, AST: Aspartato Aminotransferasa, ALT: Alanino Aminotransferasa, U/L: unidades por litro, g/dL: g por decilitro.

y 100 ppm de FB_1 , los de la menor concentración de PT plasmáticas (2.15 ± 0.14 y 2.48 ± 0.13 g de proteína/100 mL de plasma respectivamente) y el de mayor concentración de PT los pollos que recibieron 0 ppm de FB_1 con 3.18 ± 0.13 g de proteína/100 mL de plasma. En cuanto al análisis de las interacciones de los factores en los 7 días post-exposición se observó diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$), donde los valores observados fueron en un rango de 1.90 a 3.50 g de proteína/100 mL de plasma, siendo los tratamientos 1 y 7 los de mayor valor (3.13 ± 0.24 y 3.50 ± 0.20 g de proteína/100 mL de plasma, respectivamente) y los de menor valor los observados en los tratamientos 3, 5 y 8 (2.17 ± 0.16 , 1.90 ± 0.23 y 2.20 ± 0.32 g de proteína/100 mL de plasma, correspondientemente). Por otra parte, en las concentraciones de PT plasmáticas observadas a los 21 días postexposición, no se logró mostrar diferencia significativa ($P > 0.05$) en los dos factores principales del diseño. Sin embargo, en la interacción de ambos factores sí se mostró diferencia significativa ($P < 0.05$). Los rangos observados fueron de 2.63 a 4.01 g de proteína/100 mL de plasma. Se presentó una mayor concentración de PT plasmáticas en los pollos que recibieron el tratamiento 7 (4.01 ± 0.15 g de proteína/100 mL de plasma) con respecto a los tratamientos 4 y 8, en los cuales se obtuvo una menor concentración de PT (2.73 ± 0.34 y 2.76 ± 0.21 g de proteína/100 mL de plasma, correspondientemente). Estos resultados pueden deberse a las alteraciones funcionales hepáticas observadas; efectos similares han sido reportados por Watts *et al.* (23) en investigaciones efectuadas en pollos de engorde que recibieron AFB_1 en el alimento.

El estudio de biomarcadores de daño biológico por efecto de micotoxinas ha sido estudiado para relacionar el consumo de FB_1 con efectos tóxicos a la salud; las investigaciones están enfocadas a marcadores moleculares en fluidos corporales y tejidos.(19) Los avances relacionados con las fumonisinas se fundamentan en el mecanismo de daño a nivel celular, el cual involucra la inhibición de la enzima clave (N-aciltransferasa de esfingánina/esfingosina) del metabolismo de esfingolípidos. (1) La alteración ocasiona el incremento de los niveles SA y afecta la relación SA/SO, biomarcador de la exposición a fumonisinas; se ha documentado que el incremento de esta relación es indicativo del daño primario de dichas fumonisinas (19) antes de la manifestación de las lesiones. Las relaciones de SA/SO registradas, se muestran en Figura 1.

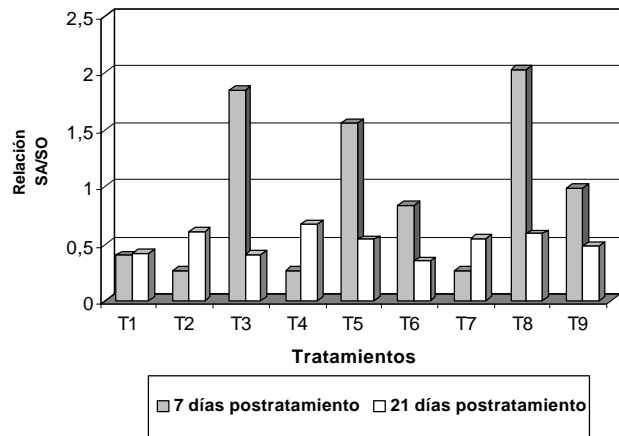


FIGURA 1. Relación SA/SO determinada en suero sanguíneo de pollo./ *Ratio SA/SO in chicken serum.*

En el presente estudio la relación SA/SO fue mayor a 1 al día 7 post-exposición en los tratamientos que incluyeron FB_1 aún en aquellos que contenían adsorbentes (T_5 y T_8), a excepción del T_2 , mientras que a los 21 días post-exposición los valores permanecieron por debajo de 1. Esto posiblemente puede atribuirse al retorno de los niveles normales de SA y SO a nivel celular, efecto previamente observado en estudios efectuados con ratas expuestas a FB_1 .(18) La disminución del complejo esfingolípido resultante de la inhibición de la biosíntesis por la FB_1 , y la acumulación de esfingánina pueden ser la causa de las patologías observadas en las toxicosis por FB_1 , debido a que los esfingolípidos están involucrados en la regulación de los receptores de la membrana celular, del intercambio de iones y de otros sistemas vitales para la función y supervivencia celular (18). El incremento de la relación SA/SO ha sido observado en otros estudios que involucran diversas especies animales y en humanos (8, 21).

Los niveles de SA en la presente investigación aumentaron significativamente ($P < 0.05$) el día 7 post-exposición en la mayoría de los grupos que recibieron dietas que incluyeron FB_1 , esto influyó en que la relación SA/SO aumentara en dichos grupos, y que fuera mayor a 1, valor considerado de riesgo toxicológico (14) ya que en condiciones normales, los niveles de SA son menores a SO, lo que permite que la relación SA/SO se conserve en niveles menores a 1. Los estudios realizados por Riley *et al.* (14) mostraron que en animales alimentados con niveles < 1 ppm de FB_1 , la relación SA/SO en suero fue de 0.34 en ratas, 0.20 en ponies y de 0.18 en cerdos. Si bien se ha informado que la alteración del metabolismo de esfingolípidos pudiera ser ocasionado por otros agen-

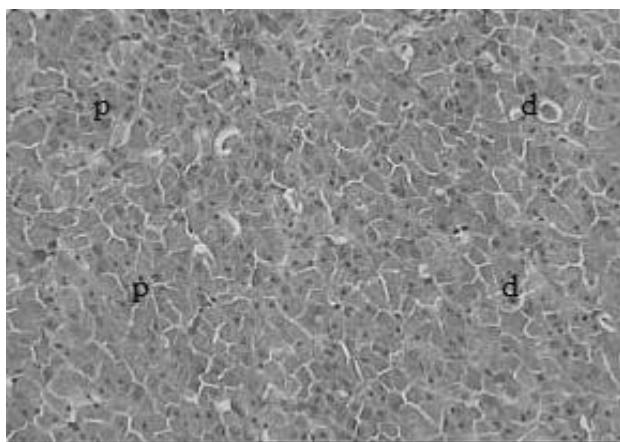


FIGURA 2. Tejido hepático de pollo de los grupos tratados con FBs, se observa necrosis celular, evidente por pycnosis (p) y degeneración de hepatocitos (d). Objetivo 20X, tinción HE./ *Chicken hepatic tissue of the groups treated with FBs. Cellular necrosis by pycnosis (p) and degeneration of hepatocytes (d) is observed. Objective 20X, stain HE.*

tes exógenos, ninguno de éstos inhiben específicamente a la enzima N-aciltransferasa de esfinganina, por lo que la elevación de la concentración de SA y la resultante inhibición de la biosíntesis de esfingosina pudiera esperarse con otros agentes (14); además, los cambios de la relación SA/SO en suero y orina requieren de una alteración persistente en los niveles de SA libre que pudiera ocurrir si la reaclación de la esfingosina fuera dañada como es el caso con fumonisinas (10).

Los estudios histopatológicos realizados en los tejidos hepático y renal (Figuras 2 y 3) mostraron alteraciones patológicas de tipo moderado; el hígado de las aves que fueron expuestas a 75 y 100 ppm de FB₁ en el alimento, presentaron necrosis focal, una evidente pycnosis, degeneración turbia y en menor grado edema intersticial; en el riñón se pudo observar necrosis focal, degeneración celular y tumefacción glomerular. Sin embargo, estas alteraciones no fueron observadas en la totalidad de los animales que recibieron los niveles de la FB₁.

En el presente estudio la evaluación de los dos adsorbentes permitió determinar bajo las condiciones experimentales utilizadas, que los dos adsorbentes mostraron un leve efecto protector similar sobre los pollos de engorde, estos resultados fueron diferentes a los reportados por Aravind *et al.* (3) y Swamy *et al.* (20) quienes encontraron un efecto protector de manano oligosacáridos, en estudios realizados en pollos y en cerdos.

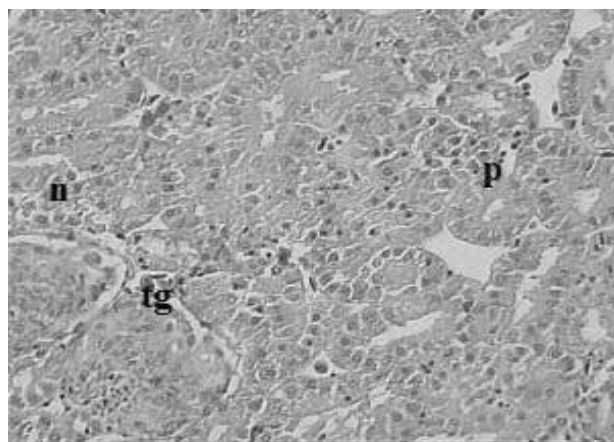


FIGURA 3. Tejido renal de pollo de los grupos tratados con FBs. Se observa necrosis celular (n), pycnosis (p) y tumefacción glomerular (tg). Objetivo 20X, tinción HE./ *Chicken renal tissue of the groups treated with FBs. Cellular necrosis (n), pycnosis (p) and glomerular tumefaction (tg) are observed. Objective 20X, stain HE.*

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la exposición a FB₁ en pollos de engorde puede ser detectada mediante biomarcadores SA y SO en suero, antes de la manifestación de daño severo en tejidos.

REFERENCIAS

1. Ahn, E.H.; Chang, C.C.; Schroeder, J.J. (2006): Evaluation of sphinganine and sphingosine as human breast cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Exp. Biol. Med.* 231(10): 1664-72.
2. AOAC (2002): 17th Edition of Official methods of Analysis. AOAC. Maryland.
3. Aravind, J.; Latre, J.; Dussert, L. (2003): Efficacy of sterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poult Sci.* 82: 571-576.
4. Beers, K.W.; Glahn, R.P.; Bottje, W.G.; Huff, W. (1992): Aflatoxin and glutathione in domestic fowl (*Gallus domesticus*) II. Effects on hepatic blood flow. *Comp Biochem Physiol.* 101: 239-44.
5. Castegnaro, M.; Garren, L.; Galendo, D.; Gelderblom, W.C.A.; Chelule, P.; Dutton, M.F. *et*

- al. (1998): C.P. Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *J. Chromatogr B* 720:15-24.
6. Doko, M.B.; Rapior, S.; Visconti, A.; Sahjoth, J.E. (1995): Incidence and levels of fumonisinas contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agric Food Chem.* 43: 429-434.
 7. Duarte, S.; Villamil, L.C. (2006): Micotoxins in public health. *Rev Salud Pública (Bogota)*. 8 Suppl. 1: 129-35.
 8. Fandohan, P.; Hell, K.; Marasas, W.F.O.; Wingfield, M.J. (2003): Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *Afr J. Biotech.* 12: 570-579.
 9. Hissin, P.J.; Hilf, R.A. (1976): Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathion in tissues. *Anal Biochem.* 74: 214-226.
 10. Ledoux, D.R.; Brown, T.P.; Weibking, T.S.; Rottinghaus, G.E. (1992): Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 330-333.
 11. Menocal, J.; González, E.; López, C.; García, A.; García, F. (2005): Efecto de paredes celulares (*Saccharomyces cerevisiae*) en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos. *Tec Pecu Mex.* 43(2): 155-162.
 12. Peterson, G.L.A. (1997): Simplification of the protein assay method of Lowry *et al*, which is more generally applicable. *Ann Biochem.* 58: 743-764.
 13. Quintana, J.A. (2003): Avitecnia: Manejo de las aves domésticas más comunes. Ed. Trillas México D.F.
 14. Riley, R.T. (1994): Liquid Chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *JAOC Int.* 77: 533-540.
 15. Santin, E.; Paulillo, A.C.; Maiorka, A.; Okada, L.S.; Marcos, Macari M. (2003): Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Poult Sci.* 2(5): 341-344.
 16. SAS Institute Inc, Statistical Analysis System. SAS/STAT^{MR} (1996): Procedures guide for personal computers. Cary, N.C.
 17. Schiele, F. (1982): Complementary information regarding recommended methods for the measurement of catalytic concentrations of alanine aminotransferase in human serum at +30°C. *Ann Bio Clin.* 40: 87.
 18. Solfrizzo, M.; Visconti, A.; Avantaggiato, G.; Torres, A.; Chulze S. (2004): *In vitro* and *in vivo* studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. *Mycophatol.* 151: 147-153.
 19. Soriano, J.M.; Gonzalez, L.; Catala, A.I. (2005): Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Prog Lipid Res.* 44(6): 345-56.
 20. Swamy, H.V.L.N.; Smith, T.K.; MacDonald, E.J.; Boermans, H.J. (2003): Effects feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pigs and efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J Anim Sci.* 81: 2792-2803.
 21. Tardieu, D.; Tran, S.T.; Auvergne, A.; Babilé, R.; Benard, G.; Bailly, J.D.; Guerre, P. (2006): Effects of fumonisins on liver and kidney sphinganine and the sphinganine to sphingosine ratio during chronic exposure in ducks. *Chem Biol Interact.* 160: 51-60.
 22. Tietz, N.W. (1999): Clinical guide to laboratory test, 3rd Saunder Co. University of Kentucky, Lexington .
 23. Watts, C.M.; Chen, Y.C.; Ledoux, D.R.; Broomhead, J.N.; Bermudez, A.J.; Rottinghaus, G.E. (2003): Effects of Multiple Mycotoxins and a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate in Poultry. *Poult Sci.* 2: 372-378.
 24. Weibking, T.S.; Ledoux, D.R.; Bermudez, A.J.; Turk, J.R.; Rottinghaw, G.E. (1993): Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁ on the young broiler chick. *Poult Sci.* 72: 456-466.

(Recibido 16-1-2007; Aceptado 25-6-2007)