

EFFECTO DEL CONSUMO DE CULTIVO DE LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰²⁶ Y/O SELENIO EN POLLOS DE ENGORDE EXPUESTOS A BAJOS NIVELES DE AFLATOXINA B₁ EN LA DIETA. 1. VALORES DE PROTEÍNAS SÉRICAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUERO

Effect of *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰²⁶ Culture and/or Selenium Intake on Broiler Exposed to Low Levels of Aflatoxin B₁ in the Ration. 1. Serum Proteins and Serum Enzymatic Activity Values

Darwin Arrieta^{1*}, María L. Pérez-Arévalo², Carlos Gómez³, Elías Ascanio¹, Belkis Irausquin⁴ y Gladys Molero⁵

¹Cátedra de Farmacología y Toxicología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Apartado postal 4563. Maracay 2101-A, Venezuela. Fax: 58-243-5506250. E-mail: darwinarrieta@yahoo.es.

²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

³Sistema Regional de Salud-Mérida. ⁴Médico Veterinario (Diagnóstico de Laboratorio). ⁵Sistema Regional de Salud-Zulia.

RESUMEN

El presente estudio fue conducido para determinar el efecto de la adición 0,1% de cultivo de levadura *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰²⁶ (CSc) y 2mg/kg de selenio (Se) en el alimento contaminado con 0,07mg/kg de aflatoxina B₁ (AFB₁), sobre la concentración de proteínas séricas (proteínas totales, albúminas, globulinas) y actividad enzimática sérica de la aspartato-amino-transferasa (ASAT) y alanino-aminotransferasa (ALAT) en pollos de engorde. Un total de 480 pollos Hubbar x Hubbar, machos, de un día de nacidos, fueron asignados al azar para recibir 8 tipos de dietas durante 42 días, cada una con 4 réplicas de 15 pollos. Estas correspondieron a los siguientes tratamientos (T) T₁: grupo control que consiste en alimento comercial (AC) sin niveles detectables de aflatoxina; T₂: AC + AFB₁; T₃: AC + CSc; T₄: AC + AFB₁ + CSc; T₅: AC + Se; T₆: AC + AFB₁ + Se; T₇: AC + CSc + Se; T₈: AC + AFB₁ + CSc + Se. La inclusión individual o combinada de CSc y Se en el alimento sin y con AFB₁ no causó cambios significativos en la concentración de proteínas séricas evaluadas y en la actividad sérica de ALAT. Se detectaron cambios (P < 0,05) en la actividad sérica de ASAT en los pollos que consumieron dietas con AFB₁ (T₂), pero este efecto fue contrarrestado por la inclusión de CSc y de Se en la dieta con AFB₁ (T₄ y T₆). No obstante, este efecto

no se observó cuando ambos aditivos (CSc + Se) se combinaron en la dieta con AFB₁ (T₈). Estos resultados sugieren aparentes propiedades individuales de cada tipo de aditivo para prevenir los efectos de la aflatoxicosis en pollos de engorde causados por bajos niveles de AFB₁ en la dieta.

Palabras clave: Aflatoxina, levadura, selenio, pollo, suero.

ABSTRACT

This trial was undertaken to determine the effects of the addition of 0.1% yeast culture *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰²⁶ (CSc) and 2mg/kg of selenium (Se) added to contaminated diets with 0.07mg/kg (70 ppb) of aflatoxin B₁ (AFB₁), on serum proteins concentration (total proteins, albumin, globulin) and serum enzymes activity of aspartate-aminotransferase (ASAT) and alanine-aminotransferase (ALAT) in broilers. 480 broilers of 1-day-old Hubbar x Hubbar males were randomly assigned to receive 8 different diets for 42 days, each diet with 4 replicates of 15 chickens. Those diets corresponded to the following treatments (T) T₁: control group receiving commercial food (CF) without detectable aflatoxin levels; T₂: CF + AFB₁; T₃: CF + CSc; T₄: CF + AFB₁ + CSc; T₅: CF + Se; T₆: CF + AFB₁ + Se; T₇: CF + CSc + Se; T₈: CF + AFB₁ + CSc + Se. Single or combined inclusion of CSc and Se in the feed whether contaminated or not with AFB₁ did not cause any significant change in the assessed serum proteins nor in serum activity of ALAT.

Changes ($P < 0.05$) were detected in serum activity of ASAT in broiler chickens fed with rations containing AFB₁ (T₂), but these effects were counterfeited by the inclusion of CSc and Se in the ration containing AFB₁ (T₄ and T₆). These effects were not observed when both additives (CSc + Se) were added to the ration containing AFB₁ (T₈). These results suggest apparent properties of each kind of additive to prevent aflatoxicosis-associated effects produced by low levels of AFB₁ added to the ration, in broiler chickens.

Key words: Aflatoxin, yeasts, selenium, chickens, serum.

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos principalmente por algunas cepas de hongos del género *Aspergillus*, describiéndose generalmente la aflatoxina B₁ como un compuesto altamente hepatotóxico en pollos de engorde [32] y hepatocarcinogénico en humanos [16]. Frecuentemente se detecta en semillas o materias primas vegetales [25], son muy termoestables y la peletización de alimentos elaborados con materias primas contaminadas no las destruyen [44], por lo que su presencia en alimentos de consumo animal es un problema de seguridad alimentaria [6, 8, 16].

En pollos de engorde, las aflatoxicosis afectan el sistema inmunitario [45] alterando su salud, índices productivos y aumentando la mortalidad, provocando pérdidas económicas importantes [32]. En los efectos hepatotóxicos se describen cambios macroscópicos y microscópicos del hígado [15, 17, 31] y alteraciones funcionales del mismo [1, 49], que van a depender principalmente del tiempo de exposición y la dosis [32].

En la actualidad las investigaciones se han enfocado a inducir aflatoxicosis con bajas concentraciones de toxina en la dieta por amplios periodos de exposición, debido a que estos casos crónicos se presentan naturalmente en condiciones de campo [40, 43, 51]. Asimismo, generalmente se reportan efectos subclínicos y no por ello menos nocivos [41], los cuales suelen pasar desapercibidos o sin cambios patológicos evidentes en los pollos de engorde y frecuentemente requieren ser demostrados por pruebas muy sensibles que permitan detectar la auténtica severidad de la aflatoxicosis por bajas concentraciones [14, 35, 43].

La determinación de valores bioquímicos sanguíneos es una importante herramienta para el diagnóstico de aflatoxicosis en pollos de engorde [42] debido a que se altera la concentración de proteínas totales, albúminas [39], globulinas [18] y ocurren variaciones significativas en la actividad sérica de enzimas relacionadas con el funcionalismo hepático, tales como, aspartato-aminotransferasa (ASAT) y alanino-aminotransferasa (ALAT), [4, 41, 47].

En respuesta a los problemas en avicultura causados por micotoxicosis, se ha utilizado el cultivo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰²⁶, cuya pared celular al parecer

tiene propiedades que contribuyen secuestrando la aflatoxina en el alimento produciendo resultados zootécnicos satisfactorios en pollos de engorde [2, 13]. Una situación semejante ocurre con el uso del selenio como protector de los efectos hepatotóxicos de la aflatoxina B₁ en aves de corral [5]. En el país se han utilizado estos productos, pero aún existe escasa documentación de tipo clínica y patológica en el sector avícola para distinguir los verdaderos beneficios de ambos aditivos ante esta hepatotoxina.

Considerando los aspectos descritos anteriormente y con el fin de contribuir en la salud y economía avícola, el presente ensayo tuvo el objetivo de evaluar la respuesta a la inclusión dietética de cultivo de levaduras *S. cerevisiae*¹⁰²⁶ (CSc) y selenio (Se), sobre la concentración de proteínas séricas (proteínas totales, albúminas, globulinas) y actividad enzimática (ASAT y ALAT) en suero de pollos de engorde, que consumen alimento con bajos niveles (0,07 mg/kg) de aflatoxina B₁ (AFB₁) durante 42 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica del estudio y manejo de las aves

El experimento se realizó en el Centro Experimental de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia (L.U.Z), ubicado en el municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela; zona clasificada como bosque seco tropical, con temperatura promedio de 30°C. Se utilizaron 480 pollitos híbridos Hubbar x Hubbar, machos, de un día de edad, seleccionados y 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 separadas y pesadas en 32 lotes de 15 pollitos cada uno y fueron distribuidos al azar en 32 corrales de tres metros cuadrados (2 × 1,5 m) cada uno, a razón de 5 aves/m² con divisiones de 0,70 m de altura. Los corrales se ubicaron dentro de un galpón avícola previamente desinfectado y fumigado dándole un periodo de descanso de 20 días. El piso fue cubierto con concha de arroz previamente fumigada, sobre la cual se ubicaron los 32 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 8 tipos de dietas experimentales, cada una con un total de 60 pollos distribuidos al azar en 4 réplicas de 15 aves por corral. Estas dietas correspondieron a los siguientes tratamientos (T) T₁: grupo control que consiste en alimento comercial (AC) sin aflatoxina; T₂: AC + AFB₁; T₃: AC + CSc; T₄: AC + AFB₁ + CSc; T₅: AC + Se; T₆: AC + AFB₁ + Se; T₇: AC + CSc + Se; T₈: AC + AFB₁ + CSc + Se.

Alimento

El alimento comercial (AC) de la dieta control fue producido en una fábrica de alimento (a base de Maíz, Sorgo y Harina de soya) sin niveles detectables de aflatoxinas. Se emplearon dos tipos de alimentos balanceados: 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. Estos se elaboraron en función a requerimientos de la línea genética de las aves y suplementados con aminoácidos, vitaminas y minerales según National Research Council [36]. Se tomaron muestras de estos alimentos por duplicado para análisis bromatológicos y en los 2 tipos de alimentos los valores son calculados, con excepción de la energía metabolizable (EM/kg MS), cuyos valores son tabulados en ambos tipos de alimentos.

El cultivo de levaduras utilizado estuvo compuesto por células de la cepa 1026 de levadura de *S. cerevisiae*, liofilizado y microencapsulado en β -glucano para protegerlo y preservar su viabilidad, según las especificaciones de los fabricantes (Alltech® Corporate Headquarters, EUA.). La inclusión de esta levadura se hizo a la concentración de 0,1% del alimento balanceado considerando estudios previos [11, 50]. La fuente de selenio utilizada para suplementar dichas dietas experimentales fue selenito de sodio ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) adicionando 2mg/kg del mismo en las dietas experimentales, según las concentraciones utilizadas en estudios anteriores [21].

El alimento balanceado fue contaminado de manera artificial con aflatoxina B₁ 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 del alimento con la toxina, se diluyó 50mg de AFB₁ en 8mL de Acetonitrilo (manufacturado por Burdick & Jackson Inc, EUA. 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 con un agitador mecánico.

La premezcla de AFB₁ (2 kg) y los dos aditivos (CSc y Se), se mezclaron con resto del alimento comercial en un mezclador y agitador de doble cinta con capacidad para mezclar 200kg, al que previamente se le practicó una prueba de homogenización según ensayos anteriores [20], utilizando harina de maíz y sulfato de cobre obteniendo un coeficiente de variación de 0,6%. Inicialmente se agregó el CSc al alimento comercial y luego el selenito de sodio en las proporciones mencionadas, luego se adicionó la porción de alimento contaminada con AFB₁ (2 kg), para obtener una concentración final de 0,07mg/kg en los tratamientos contaminados. Esta concentración se basó en los resultados de experimentos anteriores con pollos de engorde sometidos a bajos niveles de aflatoxina en la dieta [14].

Detección de aflatoxina en alimento y prueba de recuperación de aflatoxina

Se tomaron 4 muestras de alimento por tratamiento antes y después de la contaminación con AFB₁. La detección se efectuó mediante un fluorómetro VICAM Serie-4, Modelo VICAM VI.0 (EUA), diseñado para análisis de esta micotoxina con las columnas de inmunoafinidad VICAN [37]. La prueba de recuperación de AFB₁ se ejecutó por triplicado en el alimento, utilizando concentraciones (0 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,08 mg/kg y 0,18 mg/kg) de referencia. Los resultados indicaron que el alimento comercial utilizado como matriz del ensayo estaba libre de aflatoxina y el alimento contaminado registró una concentración promedio de 0,07mg/kg de AFB₁. Este valor se obtuvo utilizando la concentración de AFB₁ detectada por el equipo y corregido en función de un 81,25% de recuperación, estimado para la columna utilizada en 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 Martín [34]. Cuando los pollos llegaron a los 42 días en el experimento, se tomaron al azar 16 aves por tratamiento (4 por cada réplica), las cuales fueron separados para cada dieta experimental. 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 e identificados por tratamiento. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 2500rpm/10 minutos para obtener suero, el cual se colocó en nuevos tubos estériles y se congeló para determinar la actividad de enzimas ASAT y ALAT en suero, mediante la metodología realizada en investigaciones previas [3].

Las proteínas totales se midieron fotocolorimétricamente utilizando el método de Biuret, según ensayos anteriores [20], añadiendo 5cc de reactivo Biuret 0,1cc de la muestra de suero sanguíneo, luego de 15 minutos se realizó la lectura a una longitud onda de 540m μ , utilizando un tubo de reactivo como blanco y un patrón de concentración conocida para determinar el factor. Para medir en cada muestra de suero sanguíneo la concentración de albúminas, globulina- α_1 , globulina- α_2 , globulina- β y globulina- γ , se realizó una prueba de electroforesis utilizando la metodología descrita en estudios anteriores [38].

Análisis estadístico

Las variables correspondientes a proteínas séricas se analizaron con un modelo aditivo lineal correspondiente a un diseño completamente al azar. Las comparaciones entre los promedios se realizaron con contrastes ortogonales que pretendían comparar las medias de los tratamientos no contaminados contra el T₁ (control) y comparar los tratamientos contaminados contra el T₂ (dieta con AFB₁) y por cada tipo de dieta comparar la contaminada contra la no contaminada. Para el análisis estadístico de la actividad enzimática sérica (ASAT y

ALAT) se ejecutó la prueba de *t*-student correspondiente a este arreglo factorial, para establecer las comparaciones mencionadas anteriormente y detectar la diferencia entre tratamientos [10].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proteínas séricas

La TABLA I muestra los promedios de las proteínas séricas de los pollos muestreados por cada dieta experimental. Un patrón general de 5 bandas proteicas obtenidas de las separaciones electroforéticas, determinándose la presencia de albúmina y 4 fracciones globulínicas a saber: α_1 , α_2 , β y γ . La comparación de las concentraciones de proteínas séricas en los distintos tratamientos no presentaron variaciones significativas, indicando similitud entre los mismos. Posiblemente las bajas concentraciones de AFB₁ en la dieta (0,07 mg/kg), no causaron cambios significativos en estos parámetros bioquímicos. Estudios similares con pollos que recibieron concentraciones menores de aflatoxina en la dieta (0,05 mg/kg) y mayores (0,1mg/kg) a las del presente estudio, no detectan variación significativa en la concentración de proteínas totales y albúminas séricas a los 42 días [42], lo cual apoya la ausencia de cambios significativos obtenidos con bajos niveles de AFB₁ (0,07 mg/kg) en el presente ensayo.

Investigaciones con mayores niveles de aflatoxina (0,3 mg/kg) en la dieta [46] reportan en pollos a los 35 días de edad, reducción significativa en la concentración de proteínas séricas totales. Otros ensayos en pollos que recibieron dietas con 5 mg/kg [50] y 0,5mg/kg [12] de aflatoxina, describen niveles significativamente bajos en la concentración de de proteínas séricas totales, pero los mismos incrementan con la inclusión de 0,1% de CSc en el alimento con aflatoxina y se restablecen a valores más próximos a su grupo control. Por otro lado, ensayos en pavos que recibieron dietas con aflatoxina y selenio, reportan altos valores en las proteínas totales, albúminas, α y β globulinas, indicando, según los autores, un efecto protector del selenio contra la aflatoxicosis experimental [5]. Asimismo, pollos inyectados con AFB₁ presentaron baja concentración de γ -globulinas sérica, pero al recibir Se (1 mg/kg) en la dieta presentaron un mejoramiento significativo en los niveles de globulinas- γ [22].

Actividad de enzimas ASAT y ALAT en suero

La TABLA II presenta los promedios de la actividad en suero de ASAT y ALAT. Las medias de actividad en suero de ALAT en los tratamientos contaminados (T₂, T₄, T₆ y T₈) presentaron un incremento no significativo con respecto a la media de los tratamientos no contaminados (T₁, T₃, T₅ y T₇). En pollos sometidos a dietas con AFB₁ (42 días), con iguales nive-

TABLA I
PROMEDIOS DE PROTEÍNAS SÉRICAS (g/100mL): PROTEÍNAS TOTALES (PT), ALBÚMINAS (Alb), GLOBULINA- α_1 (α_1), GLOBULINA- α_2 (α_2), β -GLOBULINA (β) y GLOBULINA- γ (γ) EN POLLOS DE ENGORDE ALIMENTADOS CON UNA DIETA SIN Y CON AFB₁ (0,07 mg/kg) Y SUPLEMENTADOS CON 0,1% de CSc Y/O 2mg/kg DE Se DURANTE 42 DÍAS /
SERUM PROTEINS (G/100 ML) CONCENTRATION MEANS: TOTAL PROTEINS (PT), ALBUMIN (Alb), GLOBULIN- α_1 (α_1), GLOBULIN- α_2 (α_2), GLOBULIN- β (β), GLOBULIN-ggg (γ) IN BROILER RECEIVING DIET WITHOUT OR WITH AFLB₁ (0.07 mg/kg), AND SUPPLEMENTED WITH 0.1% CSC AND/OR 2mg/kg Se.DURING 42 DAYS

	Tratamientos (T)				Proteínas Séricas°						
	AFB ₁	CSc	Se	CSc+Se	PT	Alb	α_1	α_2	β	γ	R A/G
T ₁	–	–	–	–	3,350 ±0,52	1,743 ±0,20	0,213 ±0,04	0,263 ±0,04	0,250 ±0,04	0,871 ±0,38	1,118 ±0,19
T ₂	+	–	–	–	3,988 ±0,76	1,809 ±0,15	0,250 ±0,08	0,326 ±0,13	0,346 ±0,27	1,251 ±0,64	0,946 ±0,37
T ₃	–	+	–	–	3,988 ±0,20	1,809 ±0,09	0,250 ±0,13	0,326 ±0,09	0,346 ±0,06	1,251 ±0,14	0,946 ±0,10
T ₄	+	+	–	–	3,500 ±0,40	1,580 ±0,15	0,161 ±0,05	0,460 ±0,18	0,259 ±0,10	2,055 ±0,79	0,871 ±0,24
T ₅	–	–	+	–	3,825 ±0,38	1,733 ±0,15	0,286 ±0,17	0,420 ±0,18	0,360 ±0,34	1,025 ±0,50	0,974 ±0,38
T ₆	+	–	+	–	3,488 ±0,22	1,540 ±0,21	0,133 ±0,11	0,463 ±0,14	0,231 ±0,02	1,115 ±0,26	0,944 ±0,28
T ₇	–	–	–	+	3,350 ±0,16	1,413 ±0,17	0,298 ±0,11	0,478 ±0,10	0,236 ±0,06	1,926 ±0,18	0,746 ±0,17
T ₈	+	–	–	+	3,538 ±0,44	1,521 ±0,37	0,290 ±0,17	0,456 ±0,15	0,253 ±0,07	1,016 ±0,54	0,838 ±0,34

AFB₁= Aflatoxina B₁. CSc= cultivo de levaduras S. cerevisiae. Se= Selenio. R A/G= relación albúmina/globulina. ± = desviación estándar.
° No hay diferencia significativa entre tratamientos (P > 0,05).

TABLA II

PROMEDIOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SÉRICA DE ASAT Y ALAT EN POLLOS DE ENGORDE QUE RECIBIERON DIETAS SIN Y CON AFB₁ (0,07 mg/kg) Y SUPLEMENTADOS CON 0,1% DE CSc Y/O 2mg/kg Se DURANTE 42 DÍAS / MEAN ENZIMATIC ACTIVITY IN SERUM OF ASAT Y ALAT IN BROILER RECEIVING DIET WITHOUT OR WITH AFLB₁ (0,07 mg/kg) AND SUPPLEMENTED WITH 0.1% CSc AND/OR 2mg/kg Se.DURING 42 DAYS

	Tratamientos (T)				Promedio de Actividad Enzimática			
	AFB ₁	CSc	Se	CSc+Se	ASAT (UI/L)	EEM	ALAT (UI/L)	EEM
T ₁	–	–	–	–	240,01 ^a	± 8,14	3,42 ^a	±0,53
T ₂	+	–	–	–	211,96 ^{bc}	±10,12	4,78 ^a	±1,02
T ₃	–	+	–	–	225,28 ^{abc}	± 5,82	4,28 ^a	±0,71
T ₄	+	+	–	–	238,66 ^{ab}	±12,71	4,74 ^a	±1,32
T ₅	–	–	+	–	230,54 ^{ab}	± 7,98	3,31 ^a	±0,51
T ₆	+	–	+	–	219,52 ^{abc}	±10,04	3,34 ^a	±0,97
T ₇	–	–	–	+	205,23 ^c	±10,39	3,10 ^a	±0,75
T ₈	+	–	–	+	200,03 ^c	± 9,79	4,50 ^a	±1,05

AFB₁= Aflatoxina B₁. CSc= cultivo de levaduras *S. cerevisiae*. Se= Selenio. ^{abc}Medias con distinto superíndice en la misma columna son diferentes (P < 0,05). EEM: Error Estándar de la Media. ASAT: aspartato-aminotransferasa; ALAT: alanino-aminotransferasa. UI/L: Unidades Internacionales/litro.

les de AFB₁ (0,07 mg/kg) a los de presente estudio, no se encontró variación significativa en la actividad sérica de esta enzima [3], mientras que otros ensayos [42], obtienen diferencia significativa en la actividad sérica de ALAT en pollos que recibieron bajos niveles de aflatoxina (0,1 mg/kg y 0,05 mg/kg) en la dieta. Por otro lado, pollos sometidos a dietas experimentales (28 días), con mayores niveles de AFB₁ (1 y 3 mg/kg), a los del presente ensayo, no encuentran variación significativa en la actividad sérica de esta enzima [4]. No obstante, otros autores consideran que esta enzima no es la más sensible para detectar alteraciones hepáticas en aves, debido a su alta variación [27, 33].

La ingestión de alimento con 0,07mg/kg de AFB₁ (T₂), redujo (P < 0,05) la actividad sérica de ASAT con respecto al promedio del control (TABLA II). Experimentos en pollos con los mismos niveles de AFB₁ (0,07 mg/kg) en la dieta e igual periodo de exposición (42 días), a los del presente ensayo, evidenciaron disminución significativa en la actividad sérica de ASAT, acompañado de una significativa frecuencia de lesiones histopatológicas hepáticas [3]. Estudios similares con menores niveles (0,05 mg/kg) de aflatoxina en la dieta, también describen disminución significativa de la actividad sérica de ASAT en pollos a los 42 días [42]. Otros autores reportan hepatotoxicidad en pollos con igual periodo de exposición (42 días) y niveles similares de aflatoxina (0,075 mg/kg) en la dieta [14], a los del presente estudio. Ensayos con pollos sometidos a mayores niveles de aflatoxina (2,5 a 3,5 mg/kg) en la dieta, asocian la disminución de la actividad sérica de ASAT a la alteración en síntesis de proteínas que producen las aflatoxicosis [26, 29, 30]. Probablemente, el significativo descenso en la actividad sérica de ASAT en el presente ensayo se debe a la misma razón.

Al comparar los grupos de aves que recibieron CSc sin y con AFB₁ (T₃ y T₄), no se detectó variación significativa en la

actividad de ASAT. Por otro lado, la significativa disminución en la actividad de ASAT detectada en pollos que recibieron AFB₁ (T₂), fue restablecida a un promedio similar al del control (TABLA II) en aves que recibieron dietas con 0,1% de CSc + AFB₁ (T₄). Otros autores obtienen resultados similares en pollos que recibieron la misma concentración de CSc en la dieta con mayores niveles de aflatoxina (5 mg/kg), sugiriendo que la severidad de la aflatoxicosis fue disminuida por este aditivo [50]. Investigaciones semejantes en pollos de engorde utilizaron derivados de la pared celular de *S. cerevisiae* en dietas con mayores niveles de AFB₁ (0,3 mg/kg) a los del presente ensayo, reportando un comportamiento similar al observado en la actividad sérica de ASAT del presente estudio [46].

Las comparaciones de la actividad sérica de ASAT entre tratamientos que incluyen Se en la dieta sin y con AFB₁ (T₅ y T₆), no se encontró diferencia significativa, señalando similitud entre los tratamientos para la actividad de ASAT. Igualmente, el significativo descenso en la actividad sérica de ASAT causado por la ingestión de AFB₁ (T₂), fue incrementado a niveles que no presentaron diferencia significativa con el control (TABLA II) al incluir esta fuente de Se en la dieta con AFB₁ (T₆), indicando una aparente disminución de la toxicidad. Estudios en mamíferos [48] y pollos [7] demostraron que el Se (selenito de sodio) tiene propiedades para disminuir la formación de aducciones ADN-AFB₁. En patos la suplementación con Se (1 y 2 mg/kg de selenito de sodio) redujo las lesiones hepáticas, causadas por el consumo de alimento con aflatoxina (0,025 mg/kg) [52].

Otros experimentos obtienen un significativo incremento en la actividad sérica de ASAT, en pollos de engorde que recibieron alimento con mayor nivel de AFB₁ (10 mg/kg), pero al suplementar con la misma fuente de Se (0,05 mg/kg de selenito de sodio) utilizada en nuestro ensayo, el promedio de la ac-

tividad de ASAT no incrementó significativamente como se observó en aquellas aves que sólo recibieron AFB₁ en la dieta. Por su parte, los autores atribuyen este efecto a una disminución de la hepatotoxicidad por la ingestión de esta fuente de Se [9]. Estudios en pavipollos reportan que la suplementación con esta fuente de Se (0,2, 2 y 4 mg/kg de selenito de sodio) en dietas con AFB₁ (500 ng/g), redujo significativamente la relación de aflatoxina libre/conjugada en los grupos con 2 y 4mg/kg de selenito de sodio [21]. Los autores sugieren que la suplementación con Se contribuye a la formación de formas conjugadas hidrosolubles de aflatoxina, lo cual puede promover la eliminación de la misma.

Los tratamientos combinados de CSc + Se sin y con AFB₁ en la dieta (T₇ y T₈), presentaron valores en la actividad enzimática sérica de ASAT muy semejantes, indicando similitud entre los mismos. Sin embargo, ambos grupos presentaron una significativa disminución en la actividad sérica de ASAT (T₇ y T₈) con respecto al control (TABLA II), indicando aparente alteración hepática en las aves de ambos grupos independientemente de la ingestión de alimento con AFB₁. En aves, la actividad sérica de ASAT es considerada un sensible indicador de daño o disfunción hepatocelular [27, 28].

Estos daños pueden manifestarse en necrosis u otra alteración que incremente la permeabilidad celular, con liberación e incremento inmediato de esta enzima en suero [49]. Sin embargo, otros autores manifiestan que estos cambios no necesariamente involucran disfunción hepática a pesar de un daño, en razón de que un perfil normal de esta enzima tampoco evidencia una función hepática normal, debido a que en casos de lipidosis o fibrosis hepática severa pueden producirse daños o ruptura hepatocelulares sutiles, pudiendo resultar valores normales en la actividad sérica de ASAT y en algunos casos disminución de los mismo, por lo que los diagnósticos de hepatopatías en aves nunca debería basarse en los valores de ASAT sin el apoyo de otras pruebas [19].

Por otro lado, el efecto de estos dos aditivos en conjunto (CSc + Se) sobre la aflatoxicosis en pollos es poco documentado. Asimismo, los mecanismos para contrarrestar la toxicidad de la aflatoxina por las propiedades de la pared celular del CSc aún no están totalmente claros [2, 11, 46]. Sin embargo, estudios en aves acuáticas suplementadas con otras fuentes de Se (selenio-levaduras) en dietas sin aflatoxinas, revelan mediante pruebas de laboratorio, estrés oxidativo hepático dosis dependiente en diferentes estados del ciclo de vida de estas aves, incluyendo alteraciones en el metabolismo del glutatión y peroxidación lipídica [24]. Probablemente estos efectos son debido a propiedades de estas fuentes de Se para causar alteración hepatocelular descritas en otras investigaciones sobre aves [23].

Los reportes citados previamente indican hepatotoxicidad, condición que también podría afectar los pollos que recibieron la combinación de Se y levadura (CSc + Se) en el ali-

mento, pudiendo ser esta una probable razón para explicar la disminución significativa en la actividad sérica de ASAT que se presentó, tanto en pollos que recibieron CSc + Se con AFB₁ en la dieta (T₈), como en aquellos que recibieron CSc + Se en dietas sin AFB₁ (T₇).

Por otra parte, de haber una posible alteración hepatocelular causada por la inclusión dietética de ambos aditivos (CSc + Se), debió haber sido muy leve para comprometer el funcionamiento hepático de estas aves, en razón de que estos cambios ($P < 0,05$) detectados en la actividad sérica de ASAT (TABLA II), no se presentaron en pollos que recibieron CSc sin y con AFB₁ (T₃ y T₄), ni en aquellos que recibieron Se sin y con AFB₁ en la dieta (T₅ y T₆). Asimismo, no se detectó variación significativa en las concentraciones de proteínas séricas evaluadas (TABLA I) en los pollos de estos tratamientos (T₇ y T₈). Además, hay que destacar que ensayos ejecutados simultáneamente con este estudio [20] demostraron que los pollos de todos los tratamientos (T₁ al T₈), no presentaron efectos negativos sobre el peso, conversión de alimento, ganancia de peso corporal y consumo de alimento a los 42 días.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

No se presentaron cambios significativos en la concentración de proteínas séricas evaluadas ni en la actividad sérica de ALAT. Sin embargo, en pollos que consumieron bajos niveles de AFB₁ (0,07 mg/kg) durante 42 días, se detectaron cambios ($P < 0,05$) en la actividad sérica de ASAT, indicando probable alteración hepatocelular, pero al parecer este efecto fue contrarrestado, tanto por la inclusión de cultivo de levaduras *S. cerevisiae*¹⁰²⁶ como por la de Se (selenito de sodio) en la dieta con AFB₁. No obstante, cuando ambos aditivos se incluyeron en la dieta sin y con AFB₁ este efecto no se observó. Estos resultados sugieren una aparente propiedad individual de cada tipo de aditivo para prevenir los efectos de la aflatoxicosis en pollos de engorde causados por bajos niveles de AFB₁ en la dieta.

Es recomendable realizar nuevos estudios para comparar el efecto de la inclusión individual o combinada del cultivo de levaduras *S. cerevisiae*¹⁰²⁶ y selenito de sodio (u otras fuentes de selenio), en pollos de engorde que consuman dietas con bajos niveles de AFB₁, utilizando varios parámetros de química sanguínea, acompañado de evaluaciones en la morfología hepática.

AGRADECIMIENTO

Al laboratorio de Farmacología y Toxicología de la FCV de la Universidad Central de Venezuela, al laboratorio de Química Sanguínea del Instituto Hematológico de Occidente, al laboratorio de Nutrición Animal de la FCV-LUZ y al CONDES-LUZ.

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] ARAVIND, K.L.; PATIL, V.S.; DEVEGOWDA, G.; UMAKANTHA, B.; GANPULE, S.P. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and haematological parameters in broilers. **Poult Sci.** 82(4):571-6. 2003.
- [3] ARRIETA, D.M.; PÉREZ, A.M.; GÓMEZ, C.; MOLERO, G.; NOVOA, E.; RINCÓN, H.; ASCANIO, E. Efecto del alimento contaminado con aflatoxina B₁ (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.
- [4] BALACHANDRAN, C.; RAMARKRISHNAN, R. Influence of dietary aflatoxin on certain serum enzyme levels in broiler chickens. **Mycopathol.** 101(2):65-7. 1988.
- [5] BURGUERA, J.A.; EDDS, G.T.; OSUNA, O. Influence of selenium on aflatoxin B₁ or crotalaria toxicity in turkey poults. **Am J of Vet Res.** 44:(9) 1714 -1717. 1983.
- [6] CAVALHEIRO, A.C.L. Aflatoxinas y Aflatoxicosis: Revisión. **Rev. Avicult.** 27:77-81. 1983.
- [7] CHEN, J.; GOETCHIUS, M.P.; COMBS, G.F.JR.; CAMPBELL, T.C. Effects of dietary selenium and vitamin E on covalent binding of aflatoxin to chick liver cell macromolecules. **J. Nutr.** 112(2):350-5. 1982.
- [8] 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.
- [9] DALVI, R.R.; ADEMOYERO, A.A. Toxic effects of aflatoxin B₁ in chickens given feed contaminated with *Aspergillus flavus* and reduction of the toxicity by activated charcoal and some chemical agents. **Avian Dis.** 28(1):61-9. 1984.
- [10] DANIEL, W.W. Estadística no paramétrica y de libre distribución. En: **Bioestadística: Bases para el Análisis de las Ciencias de la Salud.** 5^{ta} Ed. Editorial Noriega Editores. 710-736 pp. 1995.
- [11] DEVEGOWDA, G.; ARAVIND, B.I.R.; RAJENDRA, K.; MORTON, M.G.; BABURATHNA, A.; SUDARSHAN, C.A biological approach to counteract aflatoxicosis in broiler chickens and ducklings by the use of *Saccharomyces cerevisiae* cultures added to feed. In: **Proc. Alltech's 10th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry** (Ed: T.P. Lyons y K. A. Jacques). Nottingham University Press, Loughborough, Leic Uk. 235-245 pp. 1994.
- [12] DEVEGOWDA, G.; ARAVIND, B.I.R.; MORTON, M.G.; RAJENDRA, K.A biotechnological approach to counteract aflatoxicosis in broiler chickens and ducklings by the use of *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Proc. Feed Ingredients Asia 95**, Singapore. 161-171 pp. 1995.
- [13] DEVEGOWDA, G.; ARAVIND, B.I.R.; MORTON, M.G. Immunosuppression in poultry caused by aflatoxins and its alleviation by *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sacc¹⁰²⁶), and mannanoligosaccharides (Micosorb). **Biotechnology in the Feed Industry.** Nottingham University Press. Nottingham, United Kingdom: 205-215pp. 1997.
- [14] DOERR, J.A.; HUFF, W.E.; WABECK, C.J.; CHALOUKKA, G.W.; MAY, J.D.; MERKLEY, J.W. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poult Sci.** 62 (10):1971-7. 1983.
- [15] ESPADA, Y.; DOMINGO, M.; GÓMEZ, J.; CALVO, M.A. Pathological lesions following an experimental intoxication with aflatoxin B₁ in broiler chickens. **Res. Vet. Sci.** 53:275-279. 1992.
- [16] FAO/OMS. Contaminantes: aflatoxinas. En: El 49^{vo} Informe Técnico del Comité Mixto (FAO/OMS) de Expertos en Aditivos Alimentarios. OMS-Ginebra. 73-87pp. 1999.
- [17] 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.
- [18] FERNÁNDEZ, A.; VERDE, M.T.; GÓMEZ, J.; GASCON, M.; RAMOS, J.J. Changes in the prothrombin time, haematology and serum proteins during experimental aflatoxicosis in hens and broiler chickens. **Res. Vet. Sci.** 58(2):119-22. 1995.
- [19] FUDGE, A.M. Avian Liver and Gastrointestinal Testing. In: **Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets.** Edited by A. M. Fudge. 47-55 pp. 2000.
- [20] GÓMEZ, C.C. Influencia del cultivo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰²⁶ y selenio sobre la toxicidad de la aflatoxina B₁ en pollos de engorde. La Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, División de Postgrado (Trabajo de Grado). 25-59pp. 2003.
- [21] GREGORY, J.F.3RD; EDDS, G.T. Effect of dietary selenium on the metabolism of aflatoxin B₁ in turkeys. **Food Chem Toxicol.** 22(8): 637-42. 1984.
- [22] HEGAZY, S.M.; ADACHI, Y. comparison of the effects of dietary selenium, zinc and selenium and zinc supple-

- mentation on growth and immune response between chick groups that were inoculated with *Salmonella* and aflatoxin or *Salmonella*. **Poult. Sci.** 79(3):331-5.2000.
- [23] HOFFMAN, D.J. Role of selenium toxicity and oxidative stress in aquatic birds. **Aquat. Toxicol.** 57(1-2):11-26. 2002.
- [24] HOFFMAN, D.J.; HEINZ, G.H.; LECAPTAIN, L.J.; EISEMANN, J.D.; PENDLETON, G.W. Toxicity and oxidative stress of different forms of organic selenium and dietary protein in mallard ducklings. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 31(1):120-7. 1996.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] JONES, P.M. Avian Clinical Pathology. In: **Veterinary Clinics of North American: Exotic animal practice**. Vol 2. N° 3. 663-685pp. 1999.
- [28] KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; BAILEY, R.H.; BUCKLEY, S.A.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. **Poult. Sci.** 77(10):1502-9. 1998.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] LEDOUX, D.R.; ROTTINGHAUS, G.E.; BERMUDEZ, A.J.; ALONSO-DEOLT, M. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chickens. **Poult. Sci.** 78:204-210. 1999.
- [32] LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. Aflatoxins. In: **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins**. University Books. Guelph, Ontario, Canada. 249-298 pp. 1995.
- [33] LUMEIJ, J.T. Hepatology. In: **Avian Medicine Principles and Application**. Unabridged Edition, B. RITCHIE, W.; G.J. HARRISON; L.L. Harrison (Eds). 275-280pp. 1997.
- [34] MARTIN, F.G. **Statistical Design and Analysis**. University of Florida, Copy Center. UF. 2-4 a 2-7 pp. 1995.
- [35] MAURICE, D.V.; BODINE, A.B.; REHRER, N.J. Metabolic effects of low aflatoxin B₁ levels on broiler chicks. **Appl. Environ. Microbiol.** 45(3):980-4. 1983.
- [36] NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Poultry**. 9th Ed. National Academy Press, Washington D.C. 11-15pp.1994.
- [37] OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (AOAC). In: **Natural Toxins**. M. W. Trucksess, Ed. Chapter 49. 38-40pp. 2000.
- [38] OCANDO, D.; RIVERA, S.; AJJAM, E.; SALAS, R. Caracterización proteica del suero del ave *Coragyps atratus* (Zamuro de Cabeza Negra) y algunos estudios inmunoserológicos. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** 1(2):57-70. 1991.
- [39] OGUZ, H.; KECECI, T.; BIRDANE, Y.O.; ONDER, F.; KURTOGLU, V. Effect of clinoptilolite on serum biochemical and hematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. **Res. Vet. Sci.** 69(1):89-93. 2000.
- [40] 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.
- [41] OGUZ, H.; HADIMLI, H.H.; KURTOGLU, V.; ERGANIS, O. Evaluation of humoral immunity of broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Rev. de Med. Vet.** 154:483-486. 2003.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] RAJU, M.V.L.N.; DEVEGOWDA, G. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology serum biochemistry and Haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (Aflatoxin, Ochratoxin and T-2 toxin). **Br. Poult. Sci.** 4:640-650. 2000.

- [47] 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.
- [48] SHI, C.Y.; CHUA, S.C.; LEE, H.P.; ONG, C.N. Inhibition of aflatoxin B1-DNA binding and adduct formation by selenium in rats. **Cancer Lett.** 82(2):203-8. 1994.
- [49] SHUKLA, S.K.; PACHAURI, S.P. Blood biochemical profiles in induced aflatoxicosis of cockerels. **Br Poult Sci.** 36(1):155-60. 1995.
- [50] STANLEY, V.G.; OJO, R.; WOLDENSENBET, S.; HUTCHINSON, D.H. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. **Poult. Sci.** 72:1867-1872. 1993.
- [51] SURAI, F.P.; DVORSKA, E.J.; SPARKS, H.N.; JACQUES, A.K. Impact of mycotoxins on the body's antioxidant defense. In: **Proc. Alltech's 18th Annual Symposium on Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries** (Ed: T.P. Lyons y K. A. Jacques). 131-141pp. 2002.
- [52] YU, S.Y.; ZHU, Y.J.; LI, W.G. Protective role of selenium against hepatitis B Virus and primary liver cancer in Qidong. **Biol. Trace. Elem. Res.** 56(1):117-24. 1997.