

TOXICIDAD DEL AMINOACIDO NO PROTEINICO *L-canavanina* EN POLLOS DE ENGORDE

Toxicity of the Nonprotein Amino Acid *L-canavanine* in Broiler Chickens

Lilliam Sivoli R., Adriana Méndez O. y Coromoto Michelangeli B.

Centro de Bioquímica Nutricional, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Apartado Postal 4563. Maracay, Estado Aragua, Venezuela. E-mail: lisi8@yahoo.com

RESUMEN

La L-canavanina es uno de los factores antinutricionales presentes en los granos de *Canavalia ensiformis*. Los límites de la toxicidad de este aminoácido en aves no han sido establecidos. En consecuencia, tres ensayos fueron conducidos para evaluar la toxicidad del aminoácido no proteínico L-canavanina en pollos en crecimiento. En el primero se determinó la Dosis Letal 50 (DL50) de la canavanina empleando pollitos machos de la línea Arbor Acres (peso promedio 346g), utilizando dosis de: 0,0; 0,5; 0,9; 1,62; 2,92; 5,25 y 9,45g de canavanina/kg de peso. Seis aves constituyeron el grupo control y seis fueron asignadas a cada una de las 6 dosis de canavanina durante siete días. La canavanina fue extraída de los granos de *Canavalia ensiformis* y su pureza confirmada por RMN. La DL50 de la canavanina fue estimada en 1,86g/kg de peso. En el segundo ensayo, se determinó la desaparición de la canavanina del suero sanguíneo de pollitos, luego de 15, 30, 60, 120 ó 180 min. de haber recibido una dosis de 1g de canavanina/kg de peso, vía subcutánea, así como la concentración de canalina, un producto de degradación de la canavanina. Se evidenció un pico máximo de canavanina a los 30 min y un posterior descenso de la canavanina sérica hasta los 180 min. No se detectó canalina en suero. El tercer ensayo *in vitro*, empleando homogenizados de riñón e hígado en presencia de canavanina e incubados durante 60, 120 ó 180 min, indicó una disminución en la concentración inicial de canavanina en riñón de pollo, acompañada de un incremento de la concentración de canalina, su producto de degradación, posiblemente resultante de la acción de la arginasa renal. La concentración de canavanina en el hígado permaneció invariable. El presente trabajo demostró que la canavanina es tóxica para pollos en crecimiento; también sugiere que este aminoácido parece ser catabolizado a canalina, en el riñón, lo cual pudiera representar una vía metabólica para la degradación de la canavanina en aves.

Palabras clave: Dosis letal 50, L-canavanina, L-canalina, pollos de engorde.

ABSTRACT

L-Canavanine is one of the antinutritional factors found in *Canavalia ensiformis* raw seeds whose toxicity in poultry has not been established. Hence, three trials were conducted to assess the toxicity of L-canavanine, a non-protein amino acid, in growing chicks. In Trial 1, the Lethal Dose 50 (LD 50) was calculated using forty two male Arbor Acres chicks (average weight 346 g) dosed orally with 0.0; 0.5; 0.9; 1.62; 2.92; 5.25 or 9.45 g L-canavanine/kg BW. The trial lasted 7 days. L-canavanine was extracted from *Canavalia ensiformis* seeds and its purity was confirmed by MNR. The LD 50 for L-canavanine was estimated to be 1,86 g / kg BW. In Trial 2, the canavanine clearance from blood serum was monitored at 15; 30; 60; 120 and 180 min following a subcutaneous administration of a single dose of 1 g/kg BW of L-canavanine. Data showed a canavanine peak at 30 min. followed by a steady decrease up to 180 min. Canaline was not detected in blood serum. Additionally, in Trial 3, samples of kidney and liver homogenates were incubated with L-canavanine during 60; 120 or 180 min. Canavanine concentration in kidney samples was reduced after 60 min. This response was accompanied by a concomitant increase in canaline concentration in all kidney homogenates possibly due to the enzymatic activity of kidney arginase. Liver canavanine concentration remained unchanged. These results confirmed the toxic effects of L-canavanine for growing chicks. On the other hand, some transformations of this amino acid to canaline seem to occur in kidneys.

Key words: Lethal Dose 50, L-canavanine, L-canaline, broiler chickens.

INTRODUCCIÓN

La L-canavanina, ácido 2-amino-4 (guanidinooxi) butírico, es un análogo estructural de la L-arginina sintetizado por una diversidad de plantas leguminosas [7] incluyendo a la *Canavalia ensiformis* (canavalia). Este aminoácido no proteico es un potente antagonista de la arginina, el cual exhibe actividad antimetabólica en una gran variedad de organismos vivos [11], incluyendo virus, procariotes y animales vertebrados e invertebrados [8, 9].

Estudios conducidos en ratas revelaron que la canavanina era menos toxica en esta especie y que tenían una alta capacidad para metabolizar este aminoácido [11]. Por su parte, Michelangeli y Vargas [5], demostraron que la canavanina redujo tanto el consumo de alimento de pollitos en el corto plazo como la concentración de aminoácidos básicos (histidina, lisina y arginina) en el plasma de los pollos, así como la actividad de la enzima arginasa renal. Sin embargo, hasta la fecha se desconocen los posibles productos de degradación de este aminoácido en las aves; tampoco se han realizado estudios sobre la toxicidad aguda de la canavanina en pollos. En consecuencia, los objetivos del presente trabajo fueron: establecer la Dosis Letal 50 (DL50) de la canavanina en pollos de engorde en la etapa de crecimiento y contribuir al conocimiento de las vías degradativas de la canavanina en aves.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la canavanina

La extracción y purificación de la canavanina se realizó a partir de granos de *Canavalia ensiformis*, cultivar Tovar, siguiendo la metodología descrita por Bass y col.[3]. La pureza de la canavanina obtenida fue verificada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) utilizando un equipo JEOL Eclipse 270 (6.345 Tesla supercoil).

Determinación de la DL50

La DL50 para canavanina en pollos fue determinada, a partir de la administración de una única inyección, vía intraperitoneal, de diferentes dosis de canavanina (tratamientos), siguiendo el método propuesto por Weil [12].

Animales

Para la determinación de la DL50 se utilizaron 42 pollitos machos de la raza Arbor Acres, con un peso promedio de 346 ± 40g, alimentados previamente durante doce días con una dieta comercial iniciadora. A esta edad los pollitos fueron separados, por rangos de peso, en grupos de seis animales por tratamiento (dosis), para un total de siete tratamientos. Los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento.

Administración de la canavanina

La canavanina purificada fue disuelta en solución salina y el pH fue ajustado a 7,4. Se administraron las siguientes dosis: 0,5; 0,9; 1,62; 2,92; 5,25 y 9,45 g de canavanina /kg de peso vivo. Adicionalmente un grupo control fue dosificado con agua destilada. Las aves fueron observadas durante siete días, siguiendo la metodología descrita por Thomas y Rosenthal [10]. Durante este período, las aves murieron o se recuperaron de la dosificación con canavanina. Adicionalmente, se registró el consumo de alimento y ganancia de peso de los animales sometidos a la dosis de 0.9 g/kg de peso vivo, a fin de observar los efectos de la canavanina, vía intraperitoneal, sobre el consumo de la dieta y la ganancia de peso. La dosis de 0.9 g/kg de peso, fue seleccionada para esta medición ya que esta constituyó la dosis más alta a la cual no se observó mortalidad de los animales y, el valor de 0.9 g/kg es comparable con la dosis empleada posteriormente en los estudios de distribución de canavanina en suero y órganos.

Determinación de canavanina y canalina en suero de pollos

Las concentraciones de canavanina y su producto de degradación, la canalina, fueron determinadas en suero sanguíneo de pollos luego de la administración, vía subcutánea, de una sola dosis de 1g de canavanina/kg de peso vivo, en 15 pollos machos de 12 días de edad, y un peso promedio de 350g ± 10g. La concentración de canavanina fue determinada luego de 0, 15, 30, 60, 120 y 180 min. de la dosificación. A cada tratamiento (tiempo) se le asignaron 3 animales. Muestras de suero (0,5 mL) fueron mezcladas con 1,5 mL de ácido tricloroacético al 15% y colocadas en hielo por 15 min. Esta mezcla fue centrifugada por 10 min. en una centrífuga Beckman, de mesa a 6000rpm. Los sobrenadantes fueron extraídos con éter anhidro y 0,5mL de cada extracto, fue empleado para la determinación colorimétrica (Espectofotómetro Beckman, UV-visible) de la concentración de canavanina [7] y canalina [6].

Determinación de canavanina y canalina en órganos

Mediante este ensayo se estudió la desaparición de la canavanina cuando esta fue incubada con homogenizados de hígado y riñón, así como la aparición de canalina, un producto de la degradación de la canavanina por acción de la arginasa hepática o renal del pollo. A un gramo de cada tipo de tejido se le añadieron 4,5mL de tricina 0,05 M y se homogenizó por un minuto. El homogenizado fue tratado con un mL de L-canavanina 500mM y 20 µL de cloruro de manganeso 100 mM; incubando la mezcla, a 37°C. Alícuotas de 0,5 mL del homogenizado fueron obtenidas a los 0, 60, 120 y 180 min. de incubación, se añadieron 0,8 mL de ácido tricloroacético al 10% y se colocaron en hielo durante 15 min., centrifugando por 10 min a 6000rpm y lavando el sobrenadante dos veces con éter anhidro. Finalmente se tomaron alícuotas de los sobrenadantes

para la determinación de canavanina [7]. Adicionalmente, se hicieron determinaciones de canalina en riñón [11].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La pureza de la canavanina, verificada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), empleando un equipo JEOL Eclipse 270 (^{13}C e ^1H), permitió identificar la presencia de cinco átomos de carbonos con sus respectivos grupos acompañantes. El peso molecular determinado fue de 175,091 g/mol y su fórmula química $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$. No se observó la presencia de contaminantes, que pudieran indicar la presencia de otros compuestos.

La DL50 de la canavanina en pollos machos de 8 días de edad, fue de 1,86g / kg de peso vivo, con un intervalo de confianza de 1.61 a 2.16 al 95% ($P < 0,05$). Este valor indica que la canavanina es mucho más tóxica para pollos, en comparación con ratas cuyo valor reportado de DL50 para la canavanina fue de 5,0 g/kg de peso [10]; probablemente esta diferencia está asociada a una menor capacidad de las aves, en relación con las ratas, para catabolizar este aminoácido en productos menos tóxicos, o eliminarlo por la orina.

Los pollos dosificados con canavanina, se mostraron letárgicos, con disminución de los movimientos espontáneos y, en muchos casos, se observó postración. En consecuencia, se redujo el consumo de alimento y agua y, con el transcurso del periodo experimental, algunos de ellos y principalmente aquellos sometidos a las dosis más altas, se debilitaban hasta morir. Los pollos que sobrevivieron al tratamiento con canavanina, se recuperaron luego de 8h. En general, no se observaron convulsiones ni efectos neurológicos aparentes. Los animales del grupo control que fueron tratados con igual volumen de agua no manifestaron ningún síntoma.

La reducción del consumo de alimento asociada a la presencia de canavanina en dietas para pollos fue previamente demostrada por Michelangeli y Vargas [5] quienes encontraron que una dieta que contenía 10g del aminoácido /kg de dieta redujo el consumo de alimento en 30% en relación con dietas sin canavanina. Este efecto sobre el consumo de alimento, también fue observado en ratas que recibieron inyecciones intravenosas con dosis de canavanina de 2,5g/kg de peso durante cinco días [10]. Las ratas, presentaron 80% de reducción del consumo de agua y de alimento, lo cual derivó en menor crecimiento. Similarmente, las ratas recuperaron la ingestión de alimento luego de un día de finalizado el ensayo. En el presente trabajo, durante los siete días que duró el ensayo para determinar la dosis letal, en los pollos dosificados con 0.9 g de canavanina/kg de peso, se observó una reducción del 25% en el consumo y de 35% de la ganancia de peso en los pollitos que sobrevivieron al tratamiento, al compararlos con el tratamiento control sin canavanina. Otros autores también han reportado una asociación entre presencia de canavanina en la

dieta y disminuciones en el comportamiento productivo en aves [4, 5] y ratas [10].

La TABLA I, muestra los valores de canavanina en suero de pollos tratados con una dosis de canavanina de 1g/kg de peso vivo, a diferentes tiempos: 0, 15, 30, 60, 120 y 180 min. luego de la administración. Se observa un pico de canavanina a los 30 min. el cual decrece bruscamente hasta casi desaparecer a los 180 min. La rápida desaparición de la canavanina del suero sugiere que este aminoácido es rápidamente metabolizado por el pollo o excretado por la orina. Estos resultados concuerdan con los encontrados en ratas por Thomas y Rosenthal [11] quienes reportaron que el 61% de una dosis en ratas fue excretada en la orina a las 24 horas. En nuestro trabajo no fue detectada la presencia de canalina en suero de pollos, quizás debido a que este aminoácido no se acumuló en cantidades suficientemente altas en el suero como para ser detectadas por el método utilizado o que, simplemente, el mismo no fue transferido al suero, en su forma libre. Acamovic y D'Mello [1], tampoco detectaron presencia de canalina en suero de pollitos sometidos a una dieta que contenía 4g de canavanina/kg; aun cuando emplearon métodos cromatográficos para su detección (HPLC). Aun más, comparaciones realizadas por estos mismos autores entre las metodologías por HPLC y colorimétrica, no demostraron diferencias significativas en el contenido de canavanina y canalina entre estas dos metodologías [1] lo cual añade confiabilidad a nuestras determinaciones.

La TABLA II muestra la concentración de canavanina en riñón, hígado y cerebro de pollos, apreciándose una disminución de la concentración de canavanina, luego de incubar el riñón en presencia de la canavanina por 120 y 180 min. En el hígado, sin embargo, la concentración de la canavanina se mantuvo similar para estos mismos tiempos. Por su parte la concentración de canalina en riñón, aumentó con el tiempo de incubación, obteniéndose valores de 0,66 mM y 1,19 mM para los tiempos de incubación de 60 y 180 min, respectivamente (TABLA II).

Como es conocido, las aves, por su condición de ser animales uricotelicos, no presentan ciclo de la urea en el hígado.

TABLA I
CONCENTRACIÓN DE CANAVANINA EN SUERO DE POLLOS DE ENGORDE, LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE 1g DE canavanina/kg de peso

Tiempo min.	Canavanina mg/mL de suero
15	1,02 ± 0,3
30	3,93 ± 0,7
60	1,44 ± 0,3
120	0,18 ± 0,02
180	0,018 ± 0,06

Alícuotas de 0,5ml de extractos de suero precipitados con ATC (dilución 1:4) y éter nhdio fueron empleadas para el análisis colorimétrico. N= 3 ± DE.

TABLA II
CONCENTRACIÓN DE CANAVANINA Y CANALINA EN RIÑÓN E HIGADO DE POLLOS

Tiempo (min)	Riñón		Hígado	
	CAV	CAN	CAV	CAN
	mM ¹			
60	21,3 ± 83	,662 ± 0,15	05,8 ± 34	D
120	135,5 ± 25	0,813 ± 0,21	213,9 ± 68	D
180	140,0 ± 2	1,185 ± 0,44	16,1 ± 70	ND

Alícuotas de 0,5 mL de extractos de homogenizado precipitados con ATC y éter anhidro fueron empleadas para el análisis colorimétrico. N=3 ± DE. CAV: canavanina. CAN: canalina. ND: no detectado.

do y la actividad catabólica de la arginasa, es más significativa en el riñón, a diferencia de los mamíferos [2]. Así, los pollos, tendrían una mayor capacidad para metabolizar el aminoácido no proteico canavanina, un análogo de la arginina, en el riñón [5]. Las observaciones obtenidas en el presente trabajo, reafirman la hipótesis de que una vía de degradación de la canavanina en el riñón de pollo, pudiera estar asociada a su transformación enzimática a canalina, mediada por la actividad catalítica de la arginasa renal.

CONCLUSIONES

El valor de DL50 determinado en pollos de engorde de una semana de edad fue de 1.86%, con un intervalo de confianza de 1.61 a 2.16 (P<0.05).

Luego de 30 min. de haber recibido una dosis vía subcutánea, de 1g/kg, este aminoácido fue rápidamente removido de la sangre y ya a los 180 min había sido casi totalmente eliminado.

Una vía de degradación de la canavanina en el riñón de pollo, pudiera estar asociada a su transformación enzimática a canalina, mediada por la actividad catalítica de la arginasa renal.

AGRADECIMIENTO

La ejecución de este trabajo fue posible, gracias a los aportes del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH), mediante el Proyecto de Grupo No. 11.10.3863.99.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACAMOVIC, T.; D'MELLO, JP.F. HPLC Analysis of canavanine and canaline in *Canavalia ensiformis*, and in excreta and serum of chicks. **J. Sci. Food Agric.** 50:63-67. 1990.
- [2] AUSTIC, R.E.; NESHEIM, M. Role of kidney arginase in variations of the arginine requirement of chicks. **J. Nutr.** 100:855-868. 1970.

- [3] BASS, M.; HARPER, L.; ROSENTHAL, G.A.; NAPHUKET, S.; CROOKS, P. **Biochem. Syst. Ecol.** 23: 717-721. 1995.
- [4] D'MELLO, J.; WALKER, A. Detoxification of jack beans (*Canavalia ensiformis*): studies with young chicks. **Anim. Feed Sci. Technol.** 33: 117-127. 1991.
- [5] MICHELANGELI, C.; VARGAS, R.E. L-canavanine influences feed intake, plasma basic amino acids concentrations and kidney arginase activity in chicks. **J. Nutr.** 124: 1081-1087. 1994.
- [6] MICHELANGELI, C.; ROSENTHAL, G.; DAHLMAN, D. The biochemical basis for L-canavanine tolerance by the tobacco budworm *Heliothis virescens* (Noctuidae). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 2255-2260. 1997.
- [7] ROSENTHAL, G.A. The biological effects and mode of action of L-canavanine a structural analog of L-Arginine. **Q. Rev. Biol.** 52: 155-178. 1977.
- [8] ROSENTHAL, G.A. Nonprotein amino acids as protective allelochemicals. In *hervibores: Their Interaction with secondary plants metabolites*. Rosenthal, G.A. and Berenbaum, MR. Eds. 2nd Ed. San Diego, US. 34pp. 1991.
- [9] SHQUEIR, A.; BROWN D.; KLASING, K. Canavanine content and toxicity of Sesbania Leaf for growing chicks. **Anim. Feed Sci. Technol.** 25: 137-147. 1989.
- [10] THOMAS, D.; ROSENTHAL, G. Toxicity and Pharmacokinetics of nonprotein amino acid L-canavanina in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 91: 395-405. 1987
- [11] THOMAS, D.; ROSENTHAL, G. Metabolism of L-[guanidinoxy-¹⁴C] canavanine in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 91: 406 - 414. 1987.
- [12] WEIL, C. Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD50 or ED50) and instructions in their use. **Biometrics.** 8: 249-263. 1962.