

LESIONES EN POLLITOS RECIÉN NACIDOS CAUSADAS POR AFLATOXINA B₁ TRANSMITIDA VÍA TRANSOVÁRICA

Injuries in Chickens New Born Produced by Aflatoxin B₁ Transmitted Ovarian Route

María de Lourdes Pérez-Arévalo^{1}, Jorge Soto-Bracho¹, Elías Ascanio² y Darwin Arrieta-Mendoza²*

¹Unidad de Investigación en Ciencias Morfológicas (UNICIM), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

²Cátedra de Farmacología y Toxicología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

**lourdesperez.a@gmail.com, maria.perez@fcv.luz.edu.ve, darwin@yahoo.com.*

RESUMEN

Se estudió el efecto de la aflatoxina B₁, transmitida vía transovárica, sobre la presencia de lesiones en pollitos de un día de edad procedentes de gallinas que recibieron dietas con aflatoxina B₁. Utilizando 30 gallinas de la línea Isabrown, divididas en 3 grupos de 10 aves cada uno, que fueron sometidas a inseminación artificial recibiendo alimento con aflatoxina B₁ durante 10 días de la siguiente manera: tratamiento 1, niveles no detectables (control); tratamiento 2, 0,02 mg/kg y tratamiento 3, 4 mg/kg. Se obtuvieron 246 huevos fértiles correspondiendo a dos lotes de incubación: lote A, huevos recogidos durante los últimos 7 días de administración de la toxina y lote B, huevos recogidos durante los 7 días posteriores a la restricción del consumo de aflatoxina B₁; estos huevos fueron identificados por tratamiento y por lote de incubación. A todos los pollitos nacidos se les realizó necropsia durante las primeras 48 horas de vida, no observándose lesiones macroscópicas y microscópicas atribuibles a la transmisión vía transovárica de aflatoxina B₁, en proventrículo, ventrículo, intestino delgado, páncreas, encéfalo, timo, hueso, riñón, bazo y bolsa de Fabricio, en pollitos nacidos del lote A y lote B. El hígado presentó lesiones (P < 0,01) histopatológicas características de intoxicación con aflatoxina B₁, tales como necrosis individual de hepatocitos, espacios sinusoidales obliterados y leve proliferación de conductos biliares, en pollitos nacidos del tratamiento 2 (0,02 mg/kg) y 3 (4 mg/kg), tanto en el lote A, así como, el lote B. Estos resultados indican que pollitos recién nacidos pueden desarrollar hepatotoxicidad cuando provienen de gallinas alimentadas con dietas contaminadas con altos niveles (4 mg/kg) y/o bajos niveles (0,02 mg/kg) de aflatoxina B₁.

Palabras clave: Aflatoxina B₁, lesión, pollo.

ABSTRACT

The effect of aflatoxina B₁ transmitted by ovarian route via on the produced lesions in the incubated progeny of birds was studied, using 30 hens of the Isabrown line divided in three groups of 10 birds each one, which were under artificial insemination, receiving contaminated food with aflatoxina B₁ of the following manner: treatment 1, nondetectable levels (control); treatment 2, 0.02 mg/kg and treatment 3, 4 mg/kg. Two hundred forty six fertility eggs were obtained, corresponding to two incubation lot: lot A gathered eggs during the last seven days of toxin administration and lot B after to the consumption of the toxin; this eggs were identified by treatment and lot and later incubated. All chicks were subjected to necropsy within 48 hours of life. Macroscopic and microscopic injuries attributable to the transmission route ovarica of aflatoxin B₁ in proventricle, ventricle, small intestine, pancreas, brain, thymus, bone, kidney, spleen and bursa of Fabricio, in borned chicks of the lot A and lot B were not observed. The liver presented injuries (P < 0.01) histopatológicos characteristics of poisoning with aflatoxina B₁, such as individual necrosis of hepatocytes, sinusoidal spaces obliterated and mild proliferation of bile ducts, in borned chicks of the treatment 2 (0.02 mg/kg) y 3 (4 mg/kg), so much in the lot A, as well as, the lot B. These results indicate that chicks newborn can develop hepatotoxicity when they come from hens fed on diets contaminated with high levels (4 mg/kg) and/or low levels (0.02 mg/kg) of aflatoxin B₁.

Key words: Aflatoxin B₁, injuries, chicken.

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos principalmente por algunas cepas de hongos del gé-

nero *Aspergillus*, describiéndose generalmente la aflatoxina B₁ como un compuesto altamente tóxico en aves [24] y hepatocarcinogénico en humanos [38]. Frecuentemente se detecta en semillas o materias primas vegetales [19], son muy termoestables y el proceso de peletización de los alimentos elaborados con materias primas contaminadas no las destruyen [27], por lo que su presencia en alimentos de consumo animal es un problema de seguridad alimentaria [7, 10, 15]. En Venezuela se han detectado, tanto en materias primas destinadas a la elaboración de alimentos de aves, como en productos balanceados, niveles superiores a los máximos permitidos para alimentación animal [1, 16].

Entre los efectos de las aflatoxicosis en aves se describe disminución de la producción de huevos [30], efectos inhibitorios sobre el desarrollo [26], cambios en los valores hemáticos y bioquímicos normales [13, 25], disminución de la respuesta inmune [31], cambios patológicos [3, 11, 14, 23] y presencia de residuos en tejidos comestibles [5].

En las gallinas (*Gallus gallus*), la distribución de aflatoxinas en los tejidos es muy amplia y los estudios sobre sus metabolitos han confirmado la transferencia al ovario y huevos, así como a la progenie incubada [22, 37]. Qureshi y col. [31] demostraron la presencia de aflatoxina B₁ y aflatoxicol en huevos a los 7 y 14 días (d) después del tratamiento. Azzam y Gabal [4], suministrando concentraciones de 200 ppb durante 22 d detectaron aflatoxina en huevos en niveles por encima de la concentración permisible. Cilievici y col. [9] administraron aflatoxina B₁ dentro del huevo embrionado y observaron efectos embriotóxicos y teratogénicos. Ensayos similares reportan disminución significativa del hematocrito y hemoglobina [12].

Considerando lo expuesto anteriormente y con el fin de aportar mayor información sobre los efectos adversos de las aflatoxinas, para contribuir a implementar medidas de evaluación y control de estas toxinas en las materias primas y alimentos terminados, el presente trabajo tuvo como objetivo fundamental determinar el efecto de la Aflatoxina B₁, transmitida vía transovárica sobre las lesiones que ésta produce en la progenie incubada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una investigación de tipo experimental la cual se desarrolló en las instalaciones de la Unidad Experimental Avícola del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) en Turmero, estado Aragua, Venezuela, utilizándose 30 gallinas ponedoras de la línea Isabrown [21], divididas en 3 grupos de 10 aves cada uno, las cuales fueron seleccionadas por productividad (más de 80% de producción), contándose con un comedero de canal, un colector de huevos lineal y un bebedero tipo copita para cada dos jaulas, según recomendaciones emitidas por la empresa productora de la línea genética Isabrown [21].

Quince días previos al inicio del ensayo, a las gallinas les fue suministrado alimento fabricado con granos (Maíz: *Zea mays*, sorgo: *Sorghum bicolor*, soya: *Glycine max*) recién cosechados para disminuir el riesgo de colonización por hongos micotoxigénicos, con las siguientes características: 2.750 kcal y 16% de proteína, según lo recomendado en manual de manejo de la línea [21]. No se detectó aflatoxina B₁ en el alimento utilizado para las dietas experimentales analizándose según el método cuantitativo fluorimétrico Vican VI.0 [3], este alimento se suministró durante el mencionado periodo (15 días) con el objeto de eliminar posibles residuos de aflatoxina que existiera en sus organismos, basándose esto en lo referido por Chen y col. [8], quienes no detectaron aflatoxinas en ningún tejido de pollos de engorde 4 d después de restringir el consumo de alimento con la toxina, y en trabajos realizados por Sawhney y col. [32], donde reportan que el tiempo necesario para eliminar un porcentaje de las aflatoxinas en gallinas ponedoras es de 66,82 horas (h).

Al mismo tiempo se entrenaron 5 gallos (*Gallus gallus*) de la estirpe Gold Line para la extracción de semen, ya que las gallinas fueron sometidas a 4 inseminaciones artificiales, una cada 5 días a partir del primer d de consumo del alimento contaminado con aflatoxina; la práctica de inseminación se realizó según estudios previamente publicados [29]. Una vez cumplido el periodo de 15 d previos al inicio del ensayo, las aves recibieron alimento contaminado con aflatoxina B₁ durante 10 d de la siguiente manera: tratamiento 1= alimento sin niveles detectables aflatoxina B₁ (control); tratamiento 2= alimento con 0,02 mg/kg de aflatoxina B₁; tratamiento 3= alimento con 4 mg/kg de aflatoxina B₁.

El alimento fue contaminado con aflatoxina B₁ pura de *Aspergillus flavus*, procedente de laboratorios Sigma (EUA), fue pesado en las cantidades suficientes para lograr las concentraciones deseadas de 0,02mg/kg y 4mg/kg, para posteriormente realizarse la mezcla en la cantidad de alimento a ser ingerida por las aves de cada grupo tratado, basándose en el procedimiento de premezclado y mezclado previamente reportado [3], estimándose una ingestión de 115 g/ave/d, según normas de manejo Isabrown [21]. Aleatoriamente se tomaron dos muestras de cada uno de estos alimentos [10] para ser nuevamente evaluadas de según el método anteriormente mencionado, para así verificar las concentraciones deseadas de la toxina y la homogeneidad del mezclado. Las concentraciones de aflatoxina utilizadas se basaron, en el caso del tratamiento 2 (0,02 mg/kg), en la cantidad máxima de las aflatoxinas admitida para aves en Venezuela [10] y para el tratamiento 3 (4 mg/kg) en el trabajo realizado por Qureshi y col. [31], donde niveles de 5mg/kg de aflatoxinas produjeron importante disminución del porcentaje de producción e incubabilidad de los huevos.

Se obtuvieron 246 huevos fértiles correspondiendo a dos lotes de incubación: 1^{er} lote consistió en huevos recogidos durante los últimos 7 d del periodo de administración de aflatoxi-

na B₁ en la dieta, mientras que el 2^{do} lote fueron huevos recogidos durante los 7 d posteriores a la restricción del consumo de toxina en la dieta. Los huevos fértiles fueron identificados por tratamiento (1, 2, 3) y por lote de la siguiente manera: Lote A, los huevos recogidos entre el d 4^{to} y 10^{mo} de iniciado el tratamiento (siete últimos d durante la administración de la toxina en la dieta). Lote B, los huevos recogidos entre los d 11^{vo} y 17^{mo} de iniciado el tratamiento (siete d posteriores a la restricción del consumo de la toxina en la dieta).

Los huevos producidos fueron recogidos diariamente y registrados por tratamiento desde el inicio de la administración de la toxina, hasta cinco semanas posteriores a la restricción del consumo de la misma [30]. Los huevos fértiles, después de recolectados, seleccionados e identificados fueron sometidos a incubación durante 21 d como se describe en reportes anteriores [29, 30]. Los pollitos nacidos fueron sacrificados mediante sección medular y sometidos a necropsia (246 aves) durante las primeras 48 h de vida, suministrándose solamente agua durante ese periodo. Se observó la apariencia externa de los siguientes órganos: hígado, riñón, proventrículo, ventrículo, intestino delgado, páncreas, encéfalo, timo, bazo, bolsa de Fabricio y hueso. Segmentos de todos los órganos mencionados fueron fijados en formalina al 10% y procesados según método de inclusión en parafina para identificar lesiones histopatológicas.

Para el análisis de lesiones de hígado y bolsa de Fabricio, la variable respuesta fue producida en escala ordinal (0= normal, 1= leve, 2= moderada y 3= severa), debido a esto, los análisis estadísticos fueron realizados con la prueba Kruskal-Wallis [28] disponible en el paquete estadístico SAS [35], cuando se detectó diferencia entre tratamientos éstos se analizaron mediante la prueba de la suma de los rangos de Wilcoxon [28].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los órganos examinados en los 246 pollitos recién nacidos descendientes de gallinas que consumieron alimento contaminado con aflatoxina B₁ en concentraciones de 0,02 mg/kg y 4 mg/kg, no se encontraron evidencias de alteración patológica, ni macroscópica ni microscópicamente en el proventrículo, ventrículo, intestino delgado, páncreas, encéfalo y timo, en ninguno de los dos lotes (A y B) de incubación.

En bazo, un solo espécimen proveniente del grupo de gallinas que consumieron aflatoxina B₁ en concentraciones de 0,02 mg/kg del lote A de incubación mostró lesiones leves consistentes en una ligera disminución del tejido linfoide folicular, sin embargo, ninguno de los bazos provenientes del tratamiento 3 (4 mg/kg) mostraron lesión alguna.

A nivel de hueso, una sola muestra proveniente del grupo 2 (0,02 mg/kg) y del lote A de incubación, mostró una lesión leve correspondiente a escasa mineralización.

En riñón una sola muestra perteneciente al tratamiento 2 y a al lote A presentó una lesión leve consistente en una nefrosis vacuolar con escasos túbulos proximales y células tumefactas, citoplasma levemente vacuolar y núcleos conservados.

El escaso número de órganos (Bazo, hueso y riñón) con las lesiones descrita previamente, sugiere que el tratamiento (0,02 mg/kg), donde se detectan estas alteraciones microscópicas no causó cambios importantes en frecuencia y severidad histopatológica en los tejidos mencionados.

En la bolsa de Fabricio se observaron lesiones en los 3 tratamientos aplicados y en los 2 lotes de incubación del experimento, pero el análisis de varianza para los datos ordinales de las lesiones en la bolsa de Fabricio indican que no hubo diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los tratamientos en ninguno de los 2 lotes; los hallazgos observados en la bolsa de Fabricio en los 3 tratamientos fueron: para el tratamiento 1 (control) el 61,53% de las muestras resultaron normales, mientras que el 38,46% presentó lesiones leves; en el tratamiento 2 el 60,71% resultaron normales, el 35,71% presentaron lesiones leves y el 3, 57% severas; para el tratamiento 3 el 42,30 fueron normales, el 53,84% con lesiones leves y el 3,84% presentaron lesiones moderadas (TABLA I).

Las lesiones leves de la bolsa de Fabricio consistieron en focos de células linfocíticas en vía de degeneración en algunos folículos, principalmente en la zona medular; una sola muestra perteneciente al tratamiento 3, lote A presentó lesión moderada debido a un incremento en el número de focos de células en vías de degeneración y presentes en mayor cantidad de folículos, y una muestra proveniente del tratamiento 2, lote B mostró una lesión severa donde los folículos se observaron muy disminuidos de tamaño, numerosos pliegues sin folículos, hipoplasia de folículos y escasos folículos con pocas células.

El hígado fue el órgano donde se observaron las lesiones más características y atribuibles al tratamiento, las muestras de hígado pertenecientes al tratamiento 1 (control), tanto del lote A como del lote B de incubación resultaron todas normales, mientras que de las muestras provenientes del tratamiento 2 (0,02 mg/kg) el 35,71% resultaron sin lesiones aparentes, el 42,85% presentaron lesiones en grado leve y el 21,42% con lesiones moderadas; en cuanto a las muestras del tratamiento 3 (4 mg/kg) el 27,27% fueron normales, un 22,72% presentaron lesiones leves y el 50,00% lesiones moderadas. Todas estas lesiones hepáticas fueron observadas, tanto en el lote A como en el lote B de incubación. En el lote A de incubación se detectó diferencias ($P < 0,01$) entre los tratamientos. No se encontró diferencias entre el tratamiento 2 y 3 ($P > 0,01$), pero si hubo diferencias entre los tratamientos 1 y 2 así como 1 y 3. Similares resultados fueron obtenidos para el lote B de incubación, donde la comparación de los tratamientos señaló similitud entre el grupo 2 y 3 y fuertes diferencias entre los tratamientos 1 y 2 y el 1 y 3 (TABLA II).

TABLA I
FRECUENCIA DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN BOLSA DE FABRICIO DE POLLITOS RECIÉN NACIDOS, PROCEDENTES DE HUEVOS PUESTOS POR GALLINAS QUE CONSUMÍAN DIETAS CON AFLATOXINA B₁ (LOTE A) Y POSTERIOR A LA RESTRICCIÓN DE AFLATOXINA B₁ EN LA DIETA (LOTE B)

Tratamientos: niveles de aflatoxina B ₁ en la dieta	Grado de lesión	Lote A	Lote B	Total	Frecuencia (%)
1 (control)	Normal	4 ^a	4 ^a	8	61,53
	Leve	2	3	5	38,46
	Moderada	0	0	0	0
	Severa	0	0	0	0
2 (0,02 mg/kg)	Normal	12 ^a	5 ^a	17	60,71
	Leve	4	6	10	35,71
	Moderada	0	0	0	0
	Severa	0	1	1	0
3 (4 mg/kg)	Normal	7 ^a	4 ^a	11	42,30
	Leve	6	8	14	53,84
	Moderada	1	0	1	03,84
	severa	0	0	0	0

^a Columnas de valores (tratamientos) con igual superíndice en un mismo lote son similares (P > 0,01).

TABLA II
FRECUENCIA DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN HÍGADOS DE POLLITOS RECIÉN NACIDOS, PROCEDENTES DE HUEVOS PUESTOS POR GALLINAS QUE CONSUMIAN DIETAS CON AFLATOXINA B₁ (LOTE A) Y POSTERIOR A LA RESTRICCIÓN DE AFLATOXINA B₁ EN LA DIETA (LOTE B)

Tratamientos: niveles de aflatoxina B ₁ en la dieta	Grado de lesión	Lote A	Lote B	Total	Frecuencia (%)
1 (control)	Normal	12 ^a	6 ^a	18	100
	Leve	0	0	0	0
	Moderada	0	0	0	0
	Severa	0	0	0	0
2 (0,02 mg/kg)	Normal	5 ^b	5 ^b	10	35,71
	Leve	5	7	12	42,85
	Moderada	3	3	6	21,42
	Severa	0	0	0	0
3 (4 mg/kg)	Normal	4 ^b	2 ^b	6	27,27
	Leve	2	3	5	22,72
	Moderada	5	6	11	50,00
	Severa	0	0	0	0

^{ab} Columnas de valores (tratamientos) con distinto superíndice en un mismo lote son diferentes (P < 0,01).

En hígados de pollitos recién nacidos, las vacuolas lipídicas con límites bien definidos son normalmente observadas (FIG. 1), consistiendo las lesiones leves de hígado observadas en aumento del tamaño y número de estas vacuolas, las cuales en algunos casos desplazan al núcleo, pero sin observarse alteraciones del mismo y con ausencia de congestión y de necrosis celular. En las lesiones moderadas se observó un incremento en el número y tamaño de las vacuolas que desplazaban al núcleo y al citoplasma, células agrandadas con hipergranularidad del citoplasma, células degeneradas, necrosis individual de hepatocitos, trabéculas de Remak tumefactas, espacios sinusoidales obliterados y leve proliferación de conductos biliares (FIG 2).

En intoxicaciones directas con aflatoxina B₁, Espada y col. [14], utilizando dosis de 3 µg/kg de peso vivo, vía oral durante un periodo de 21 d, reportan no encontrar lesiones en el proventrículo, duodeno, páncreas y encéfalo, aunque si describen hemorragia focal en la zona medular del timo. Venkata y col. [39], en casos de intoxicación aguda (4 mg/kg de aflatoxinas durante 4 semanas) reportaron lesiones a nivel del timo consistentes en extensiva necrosis de las zonas cortical y medular con restos de material picnótico en áreas de necrosis, edema intralobular y degeneración de los corpúsculos de Hassall, mientras que en intoxicaciones crónicas (1 mg/kg durante 12 semanas) describen una moderada depleción de células linfoides en la zona cortical y medular, corteza relativamente

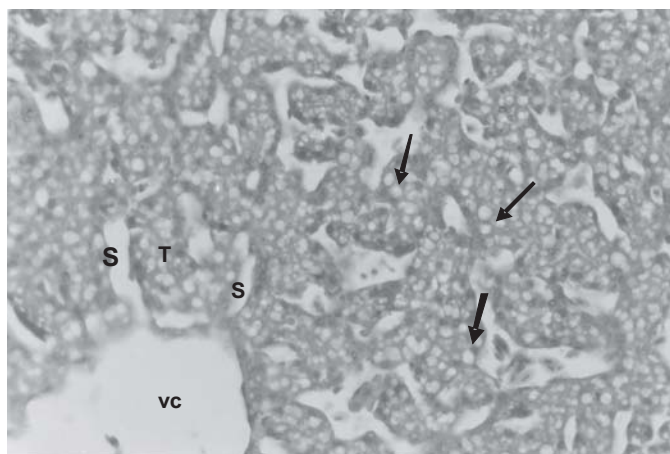


FIGURA 1. HÍGADO NORMAL DE AVE DE TRATAMIENTO 1 (CONTROL). HEPATOCITOS CON VACUOLAS LIPÍDICAS DE MEDIANO TAMAÑO, DE LÍMITES BIEN DEFINIDOS (FLECHAS), VENA CENTRAL (VC), SINUSOIDES (S), TRABÉCULAS DE REMAK (T). HEMATOXILINA-EOSINA. 176 X.

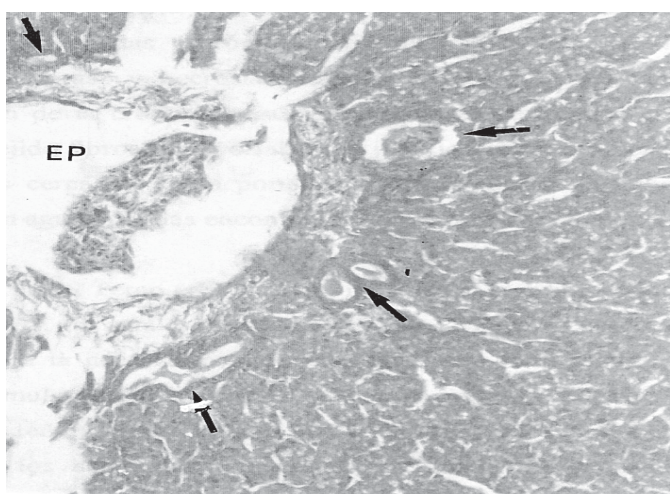


FIGURA 2. HÍGADO CON LESIÓN MODERADA DE AVE DE TRATAMIENTO 3 (4 MG/KG). OBSÉRVESE PROLIFERACIÓN DE CONDUCTOS BILIARES (FLECHAS), ESPACIO PORTAL (EP). HEMOTOXILINA-EOSINA. 88 X.

fina y medular expandida con proliferación de células reticulares y masas eosinofílicas en la zona medular.

Huff y col. [20] no encontraron efectos de las aflatoxinas sobre el peso del páncreas utilizando niveles de 1,25; 2,5 y 5mg/kg en pollos de engorde que fueron sacrificados los días 3; 6; 9; 12; 15; 17 y 21 postratamiento, pero si reportan un aumento en el peso del proventrículo el día 21 con la concentración más alta utilizada. Hamilton y Garlich [17] tampoco encontraron ningún efecto de las aflatoxinas sobre el tamaño del páncreas.

Otros estudios, reportan un aumento significativo del tamaño del bazo [17, 20], pero Sims y col. [34], tampoco encontraron lesión microscópica en el bazo, mientras que otros autores describen una depleción de células linfoides [14].

Sims y col. [34] no encontraron lesión renal en gallinas tratadas con aflatoxina B₁, mientras otros ensayos reportan lesiones renales en pollos de engorde [14] consistentes en edema intersticial, congestión capilar, dilatación irregular de algunos túbulos proximales con o sin evidencias de degeneración de células del epitelio tubular renal. Otros autores reportan aumento significativo del peso renal en intoxicación con altas concentraciones de aflatoxina B₁ [20]. Adicionalmente, Brown [6] y Siller [33] describen una lesión en membrana basal glomerular y de túbulos contorneados proximales en pavos (*Meleagris gallopavo*) y patos (*Anas acuta*), aclarando que esto no ocurre en pollos por ser una especie particularmente refractaria al efecto de la aflatoxina sobre el riñón.

La ausencia de lesiones atribuibles al efecto de la aflatoxina B₁ en proventrículo, intestino delgado, páncreas, encéfalo, timo, bazo, hueso, riñón y ventrículo, no concuerdan con los resultados observados por otros autores [14, 17, 20, 33, 34, 39], lo cual podría ser debido, principalmente, a la forma de intoxicación, ya que las lesiones reportadas por dichos autores se refieren a casos de intoxicaciones directas o por ingestión de dietas contaminadas y no transmitidas vía transovárica como en el presente ensayo.

En la bolsa de Fabricio, Espada y col. [14] reportan disminución del número de células presentes en el centro de los folículos, ocasionalmente picnosis y cariorrexis de linfocitos, y como lesión menos frecuente, la formación de quistes de varios tamaños en el epitelio. Otros autores [20, 39] en intoxicaciones agudas describen, además de las lesiones antes mencionadas, proliferación de tejido conectivo en áreas interfoliculares y descamación del revestimiento de la mucosa de la bolsa de Fabricio, mientras que en intoxicaciones crónicas observaron depleción moderada de células linfoides de los folículos, así como incremento de la secreción mucosa del lumen; estos mismos autores encontraron una disminución ($P < 0,01$) del peso de la bolsa de Fabricio [39], a diferencia de Huff y col. [20], quienes no encontraron efectos de las aflatoxinas sobre el peso de la bolsa de Fabricio.

En relación al peso del hígado, en casos de intoxicaciones directas [17] se reporta aumento significativo ($P < 0,05$) del tamaño del hígado, incremento este que no estuvo acompañado de un efecto significativo en el peso corporal, mientras que Huff y col. [20] reportan disminución significativa de su peso, lo cual no era esperado, ya que un aumento en el peso relativo del hígado es aceptado como un indicador de aflatoxicosis. Macroscópicamente, otras investigaciones [14, 34], describen una coloración amarilla, áreas de petequias y/o grandes hemorragias, así como incremento en el tamaño del órgano en 2 ó 3 veces lo normal; estas lesiones no fueron observadas en el presente ensayo. También se ha descrito lesiones microscópicas consistentes en cambios grasos, vacuolización de células hepáticas, infiltración grasa rodeando venas centrolobulillares que progresa y se extiende a todo el parénquima y proliferación del epitelio de los conductos biliares [2, 14, 34].

Hoerr [18] y Venkata y col. [39] clasificaron las lesiones hepáticas producidas por aflatoxinas en agudas y crónicas, describiendo en las intoxicaciones agudas amplia degeneración grasa y necrosis, aumento del tamaño del núcleo de los hepatocitos, marginación de la cromatina, nucléolo prominente, rápida proliferación de conductos biliares y tejido fibroso periportal, y en intoxicaciones crónicas, infiltrado de heterófilos y linfocitos cerca de vasos portales, coincidiendo las lesiones correspondientes a la intoxicación aguda con las encontradas en el presente ensayo.

Por otra parte, la inoculación de embriones de 5 d de incubación con aflatoxina B₁, los cuales fueron sacrificados 12 h postinoculación, describen que, previo a la necrosis celular se observan los nucleolos de los hepatocitos con apariencia anular, intensamente teñidos en su periferia mientras su porción central está pobremente teñido; pero, después de 12 h de exposición a la toxina la mayoría de los núcleos de los hepatocitos muestran cariorexis y/o picnosis con condensación de nucleolo [36]; en el presente trabajo no se observó el nucléolo anular antes descrito debido, probablemente, a que las muestras no fueron tomadas en estado embrionario de los pollitos.

En este experimento hay que destacar que, la hepatotoxicidad inducida vía transovárica en los pollitos se presentó, tanto en las progenie de gallinas que consumieron alimento con los mayores niveles de aflatoxina de este ensayo (4 mg/kg), así como, en las descendientes de aquellas gallinas que recibieron los niveles oficiales máximos permitidos de aflatoxina (0,02 mg/kg), para materias primas destinadas al consumo animal en el país [10]. Por esta razón, estos hallazgos cobran mayor importancia al indicar, que aún a estas concentraciones (0,02 mg/kg) en la dieta, pueden presentarse lesiones hepáticas con alta probabilidad en aquellos pollitos nacidos de reproductoras que ingieran alimentos contaminados con niveles de aflatoxina próximos a los mencionados, lo cual afectaría la salud y el desempeño productivo de las parvadas con consecuencias económicas negativas para la industria avícola.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Estos hallazgos evidencian que la ingestión de alimento contaminado con aflatoxina B₁ (0,02 y 4 mg/kg) en la dieta de gallinas puede causar una significativa ($P < 0,01$) hepatotoxicidad en pollitos recién nacidos vía transovárica y también señalan, que aquellas aves nacidas de huevos puestos durante el periodo de 7 d posterior a la restricción del consumo alimento contaminado con 0,02 y 4 mg/kg de aflatoxina B₁ en la dieta de sus madres son susceptibles a presentar hepatotoxicidad, lo cual indica una posible transmisión transovárica de residuos de aflatoxina a los huevos o progenie, a pesar de haber restringido el consumo de esta toxina en el alimento de las aves fertilizadas.

Adicionalmente, considerando la seguridad alimentaria, estos resultados sugieren que en aves (gallinas ponedoras y/o

reproductoras pesadas en última semana antes de ser beneficiadas) que se les oferten raciones elaboradas con materias primas contaminadas con aflatoxinas, probablemente presenten residuos de éstas en sus tejidos y huevos, durante un periodo igual o menor a 7 d, después de suspender la ingestión de dietas con aflatoxina, lo cual incrementa el riesgo de toxicidad por ingestión de residuos de aflatoxina en alimentos de este origen en la población humana. Por lo que es recomendable, establecer periodos de monitoreo frecuentes y continuos en la industria avícola con evaluaciones toxicológicas de los alimentos para aves, aunado a estudios patológicos y clínicos en las parvadas avícolas, especialmente en su última semana de vida antes de ir a las plantas beneficiadoras.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Consejo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo, así como a la Unidad Experimental Avícola del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Maracay, estado Aragua, por permitir realizar el ensayo en sus instalaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARRIETA, D.; MANIGLIA, G.; BRICEÑO, E.; FLORES, S.; ASCANIO, E. Aflatoxin levels in balanced feed for laying hens and broiler on the Central Region of the Bolivarian Republic of Venezuela. **J. Vet. Pharmacol. Therap.** 32 (Suppl. 1):265. 2009.
- [2] ARRIETA, D.M.; PÉREZ, M.L.; HERNÁNDEZ-FONSECA, J.; OVIEDO, M.G.; MIRANDA, S.; LUENGO, A. Efecto del consumo de cultivo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y/o selenio en pollos de engorde expuestos a bajos niveles de aflatoxina B₁ en la dieta 2: morfología hepática. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XVIII(1): 93-102. 2008.
- [3] ARRIETA, D.M.; PÉREZ, M.L.; 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] AZZAM, A.H.; GABAL, M.A. Aflatoxin and Immunity in Layer Hen. **Avian Pathol.** 27(6):570-577. 1998.
- [5] BINTVIHOK, A.; THIENGNIN, S.; DOI, K.; KUMAGAI, S. Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. **J. Vet. Med. Sci.** 64(11):1037-9. 2002.
- [6] BROWN, T.P. Urinary System In: **Avian Histopathology.** 2^{da} Ed. Canada. C. Riddell. (Ed). The American Association of Avian Pathologists. Pp 167-181. 1986.

- [7] CAVALHEIRO, A. Aflatoxinas y Aflatoxicosis: Revisión. **Rev. Avic.** 27(1):77-81.1983.
- [8] CHEN, C.; PEARSON, A.M.; COLEMAN, T.H.; GRAY, J.I.; PESTKA, J.J.; AUST, S.D. Tissue Deposition and Clearance of Aflatoxins from Broiler Chickens Fed a Contaminated Diet. **Food and Chem. Toxicol.** 22(6): 447- 451. 1984.
- [9] CILIEVICI, O.; GHIDUS, C.E.; MOLDOVAN, A. The toxin and teratogenic effects of aflatoxin B₁ on the chick embryo to development. **Morphol. Embryol.** 26(4):309-314.1980.
- [10] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Normas Venezolana Alimento Completo para Aves. Ministerio de Fomento. Método de Ensayo para Determinar Aflatoxina (1603). Caracas, Venezuela. Pp 1181-1183. 1980.
- [11] DAFALLA, R.; YAGI, A.; ADAM, S.E. Experimental aflatoxicosis in hybro-type chicks: sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes. **Vet. Human Toxicol.** 29(3):222-6. 1987.
- [12] DIETERT, R.; BLOOM, S.E.; QURESHI, M.A.; NANNA, C. Hematological toxicology following embryonic exposure to aflatoxin B₁. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** 173(4):481-483. 1983.
- [13] EDRINGTON, T.S.; KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; ROTTINGHAUS, G.E. Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or t-2 toxin in growing broilers. **Poult. Sci.** 76:1205-1211. 1997.
- [14] 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.
- [15] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (FAO/OMS). Contaminantes: aflatoxinas. En: **49^{vo} Informe Técnico del Comité Mixto (FAO/OMS) de Expertos en Aditivos Alimentarios.** OMS-Ginebra. Pp 73-87. 1999.
- [16] FERNÁNDEZ, G.; NEGRÓN, G.; ISEA, G.; SÁNCHEZ, E. Reporte de análisis cuantitativo de aflatoxinas por el método de ELISA en muestras de materias primas de alimento balanceado para aves provenientes de una planta ubicada en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** X (1):63-68. 2000.
- [17] HAMILTON, P. B.; GARLICH, J. D. Aflatoxin as a possible cause of fatty liver syndrome in laying hens. **Poult. Sci.** 50 (3):800-804.1971.
- [18] HOERR, F.J. Liver. In: **Avian Histopathology.** 2^{da}. Ed. Canada: C. Riddell. (Ed). The American Association of Avian Pathologists. Pp 143-166. 1996.
- [19] 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.
- [20] HUFF, W.E.; KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; CORRIER, D.E.; MOLLENHAUER, H.H. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. **Poult. Sci.** 65(10):1891-1899. 1986.
- [21] ISABROWN. Guía de Manejo. Service Production et Assistance Technique. Francia. 32 pp. 1996.
- [22] JACOBSON, W.C.; WISEMAN, H.G. The transmission of aflatoxin B₁ into eggs. **Poult. Sci.** 53(5):1743-1745. 1974.
- [23] KIRAN, M.M.; DEMET, O.; ORTATATH, M.; OGUZ, H. The effect of polyvinylpyrrolidone on aflatoxicosis in broilers. **Avian Path.** 27:250-255. 1998.
- [24] LEESON, S.; DÍAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. Aflatoxins. In: **Poultry Metabolic Disorders and Micotoxins.** Canada. Universities Books. Pp 249-293.1995.
- [25] 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.
- [26] OGUZ, H.; KURTOGLU, V. Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. **Br. Poult. Sci.** 41:512-517. 2000.
- [27] OSUNA, O. Micotoxinas. Problemas de Salud Pública, Efectos en Aves. Método de Análisis y Nuevos Tratamientos. **Memorias del Seminario de Actualización, Nutrición y Patologías Asociadas a Nutrición de Aves.** Maracay 06/11-12. Venezuela. Pp 1- 26. 1991.
- [28] OTT, R.L. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. 4th. Ed. Duxbury Press, 1051pp. 1993.
- [29] PÉREZ, M.L.; SOTO, J.; ROMÁN, R.; ARRIETA, D.; RINCÓN, H. Mortalidad embrionaria en pollitos causada por aflatoxina B₁ transmitida vía transovárica. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XVII (3):275-279. 2007.
- [30] PÉREZ, M.L.; ASCANIO, E.; SOTO, B.J.; ROMÁN, R.; ANGULO, I.; ARRIETA, D.; VALERIS, R. Efectos de la aflatoxina B₁ sobre la producción de huevos de consumo. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XI (4):337-341. 2001.
- [31] 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):812-819. 1998.
- [32] SAWHNEY, D.G.; VADEHARA, D.V.; BAKER, R.C. The Metabolism of 14 C Aflatoxins in Laying Hens. **Poult. Sci.** 52 (4): 1302-1309. 1973.
- [33] SILLER, W.S. Renal pathology of the fowl. A Rew. **Avian Pathol.** 10(3):189-262. 1981.

- [34] SIMS, W.M.; KELLY, D.C.; SANFORD, P.E. A study of aflatoxicosis in laying hens. **Poult. Sci.** 49(4):1082-1084. 1970.
- [35] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). User's Guide. Cary N.C. USA. Version 2.02. 1986.
- [36] TERAOKA, K.; SAKAKIBARA, Y.; YAMAZAKI, M.; MIYAKI, K. Annular nucleolus in hepatocyte of chicken embryo induced by aflatoxin B₁. **Exp. Cell Res.** 66(1):81-89. 1971.
- [37] TRUCKSERS, M.W.; STOLOFF, L.; YOUNG, K. Aflatoxicol and aflatoxins B₁ and M₁ in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin contaminated feed. **Poult. Sci.** 62(11):2176-2182. 1983.
- [38] VAAMONDE, G. Micotoxinas. En: **Toxicología de los Alimentos**. A. A. Silvestre (Ed). 2^{da} Ed. Argentina. Editorial Hemisferio Sur. Pp 153-193. 1996.
- [39] VENKATA, K.; GOPALAKRESHNA, D.; RAMA, P. Sequential gross and histological changes of bursa and thymus in acute and chronic experimental aflatoxicosis of broiler birds. **Ind. J. Anim. Sci.** 58 (9):1011- 1018. 1988.