



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TESIS**

**FUNCIÓN RENAL DE GALLINAS DE POSTURA DURANTE LA  
INTOXICACIÓN ALIMENTARIA CRÓNICA CON AFLATOXINAS**

*QUE PRESENTA*

**MC. ARMANDO MARTÍNEZ DE ANDA**

*PARA OBTENER EL GRADO DE*  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

*COMITÉ TUTORAL*

**DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES**

**DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ**

**DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ**

*REVISORES*

**DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ**

**DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN**

**Aguascalientes, Ags., México, agosto de 2010**



Centro de Ciencias Básicas

**M. en C. ARMANDO MARTÍNEZ DE ANDA  
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E .**

Estimado (a) Alumno (a) Martínez:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis titulado: **“Función Renal de Gallinas de Postura durante la intoxicación Alimentaria Crónica con Aflatoxinas”** hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., 13 de agosto de 2010  
“LUMEN PROFERRE”  
EL DECANO

DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ





**DR. FRANCISO J. ÁLVAREZ RODRÍGUEZ**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS.**  
**PRESENTE.**

Estimado Señor Decano:

Nos permitimos comunicarle que después haber analizado el trabajo de tesis doctoral "Función Renal de Gallinas de Postura Durante la Intoxicación Alimentaria Crónica con Aflatoxinas", realizado por el M. en C. Armando Martínez de Anda, estudiante de la Tercera Generación del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas (modalidad tradicional), consideramos que el trabajo:

- 1) Reúne los requisitos de una tesis de Doctorado en Ciencias.
- 2) Genera información en el área de la Toxicología Renal.

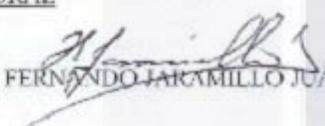
Por ello, y dado que este trabajo cumple con el requisito establecido en el Artículo 162-Inciso III del Reglamento General de Docencia de la UAA, damos nuestro voto aprobatorio para que la persona antes citada continúe con los trámites administrativos que le permitan presentar su examen de grado.

Aprovechamos este conducto para saludarlo cordialmente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., a 3 de agosto de 2010.  
"SE LUMEN PROFERRI"

COMITÉ TUTORAL

  
DR. ARTURO G. VALDIVIA FLORES

  
DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ

  
DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ

c.c.p.- Interesado.  
c.c.p.- Archivo.



**DR. FRANCISCO JAVIER ALVAREZ RODRIGUEZ**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS**

**P R E S E N T E**

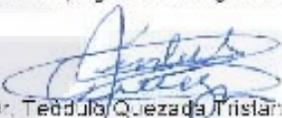
Estimado Dr. Álvarez:

Me permito comunicarle que después de haber analizado el trabajo de tesis doctoral denominado "Función Renal de Gallinas de Postura durante la Intoxicación Alimentaria Crónica con Aflatoxinas" realizado por el M. en C. Armando Martínez de Anda, estudiante del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas que se imparte en el Centro de Ciencias Básicas, considero que reúne los requisitos necesarios para una tesis Doctoral. Por ello, doy mi voto aprobatorio para que el Maestro Martínez de Anda, continúe con los trámites requeridos para la presentación de su examen de grado, conforme lo señala el Artículo 152-Inciso III del Reglamento General de Docencia de la UAA.

Aprovecho para enviarle un cordial saludo.

ATTE

Aguascalientes, Ags., 12 de agosto de 2008



Dr. Teodoro Quezada Tristán  
Prof. Investigador de la UAA

Cop. Alumna





**DR. FRANCISCO JAVIER ALVAREZ RODRIGUEZ**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS**  
**P R E S E N T E**

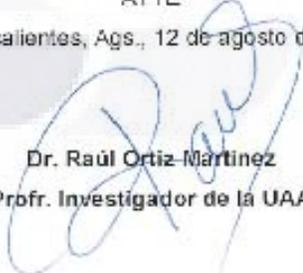
Estimado Dr. Álvarez:

Me permito comunicarle que después de haber analizado el trabajo de tesis doctoral denominado "Función Renal de Gallinas de Postura durante la Intoxicación Alimentaria Crónica con Aflatoxinas" realizado por el M. en C. Armando Martínez de Anda, estudiante del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas que se imparte en el Centro de Ciencias Básicas, considero que reúne los requisitos necesarios para una tesis Doctoral. Por ello, doy mi voto aprobatorio, para que el Maestro Martínez de Anda, continúe con los trámites requeridos para la presentación de su examen de grado, conforme lo señala el Artículo 162-Inciso II del Reglamento General de Docencia de la UAA.

Aprovecho para enviarle un cordial saludo.

ATTE

Aguascalientes, Ags., 12 de agosto de 2008

  
**Dr. Raúl Ortiz-Martínez**  
**Profr. Investigador de la UAA**

Ccp. Alumno

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Aguascalientes** a través del proyecto institucional titulado “Quimioprotección de la intoxicación alimentaria crónica con aflatoxinas en gallinas de postura” con clave PIP/SA 07-2.

Al **Dr. Rafael Urzúa Macías, Rector de la UAA**, por su confianza al otorgarme la licencia académica, que aproveché para el desarrollo de mis estudios de doctorado y la escritura de esta tesis.

A la empresa **Proteína Animal S. A.** por la donación en especie del material biológico (aves de postura), y a **Investigación Aplicada S. A. (IASA)** por contribuir con las jaulas de crianza para las aves, ya que con su aportación apoyaron en gran medida el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los Decanos del Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA, **M. C. José de Jesús Gutiérrez González (2007-2009)** y **M. C. Mario Alejandro López Gutiérrez (2009-2010)**, así como al **Dr. Raúl Ortiz Martínez**, Jefe del Departamento de Disciplinas Pecuarias, por todo el invaluable apoyo que me brindaron para la obtención del grado de Doctor.

A mis tutores **Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores, Dr. Fernando Jaramillo Juárez y Dr. José Luis Reyes Sánchez**, por acompañarme en nueva esta etapa de mi realización profesional, de quienes recibí la asesoría y el apoyo para el desarrollo de los experimentos, el análisis teórico y la redacción de este documento.

Extiendo las siguientes menciones muy especiales a los siguientes amigos y compañeros: **M.C. María Carolina de Luna López, Dr. Teódulo Quezada Tristán, LCN. María Luisa Rodríguez Vázquez y Dra. Esther Albarrán Rodríguez**, que con su gran capacidad y responsabilidad me apoyaron en las labores de intoxicación de las gallinas y en el análisis de muestras biológicas, y que gracias a ellos, se cumplieron metas importantes que se reportan en este trabajo de investigación.

También hago un reconocimiento especial a los compañeros de Servicio Social o Instructores beca que con su entusiasmo y colaboración apoyaron de manera sustantiva la culminación del presente estudio: **MVZ. Claudia Karina López, EMVZ. Karla Patricia Arriaga Fajardo, EMVZ. Juan Jeremías Ramírez Trejo, EMVZ. Néstor Cons Sosa y EMVZ. José Manuel Veloz Franco.**

## DEDICATORIAS

*A mis padres Rafaela<sup>†</sup> y J. Refugio<sup>†</sup>, quienes con su amor, trabajo y consejos, me apoyaron siempre para alcanzar cada una de las metas de mi formación, las que ahora puedo compartir y disfrutar con mi familia. A mis hermanos, Julieta, Manuel, Imelda, Rafael, Luz María, Raúl y Beatriz, con quienes he compartido los grandes momentos de mi vida.*

*A mi esposa María del Carmen, con todo mi amor, por su comprensión durante el desarrollo de mis estudios, y el aliento que me brindó en estos momentos tan importantes de mi vida.*

*A mi hijos adorables José Manuel y Mariana, que me acompañaron durante todo este tiempo tan especial para mí, y que con su cariño y alegría me impulsaron a finalizar este trabajo.*

## RESUMEN

**EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FUNCIÓN RENAL DE GALLINAS DE POSTURA DURANTE LA INTOXICACIÓN ALIMENTARIA CRÓNICA CON AFLATOXINAS.** Las aflatoxinas (AF) afectan negativamente la salud humana y de los animales, ocasionando importantes pérdidas económicas en la ganadería. Particularmente, la industria avícola sufre los estragos de la aflatoxicosis tanto aguda como crónica, ocasionando mortalidad, disminución del crecimiento y baja eficiencia alimentaria en las aves, afectando la calidad y disponibilidad de productos y por tanto su comercialización. El objetivo de este proyecto fue evaluar las modificaciones en la funcionalidad de los riñones producidas por el efecto tóxico del consumo crónico de aflatoxinas en gallinas de postura; por lo que fueron adquiridas 80 gallinas de postura que consumieron, durante 67 semanas, alimento contaminado experimentalmente con dos cepas toxicogénicas de *Aspergillus flavus*. Los resultados mostraron que la concentración de aflatoxinas y el tiempo de exposición a las mismas provocaron un decremento del peso corporal y disminución de la concentración de glutatión reducido. La interacción de la concentración de las aflatoxinas con el tiempo de exposición a las mismas produjeron un decremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la tasa de filtración glomerular, un incremento significativo en la eliminación de calcio, sodio y fosfatos ( $P < 0.05$ ), incrementos significativos ( $P < 0.05$ ) del peso relativo y en la actividad de las enzimas transferasa de glutatión y transpeptidasa de gama-glutamilo ( $\gamma$ -glutamilo). Además las aflatoxinas produjeron lesiones en el tejido renal con fueron: pérdida de arreglo estructural, mayor espacio entre estructuras renales, aumento del espacio de Bowman, amiloidosis localizada, infiltración linfocitaria, desprendimiento celular del borde en cepillo y degeneración celular. Estos resultados sugieren que la ingestión crónica de AF afecta la función renal de gallinas de postura e induce pérdidas de calcio, sodio y fosfatos, que son de gran importancia para la industria avícola.

**Palabras clave:** avicultura, hemodinámica renal, manejo renal de electrolitos, aflatoxicosis crónica, nefrotoxicidad.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Contenido	Página
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	LAS MICOTOXINAS	3
2.2.	CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LAS AFLATOXINAS	4
2.2.1.	Importancia de las micotoxinas en avicultura	6
2.2.2.	Aflatoxinas en insumos para la alimentación animal	7
2.2.3.	Análisis de las aflatoxinas	8
2.3.	METABOLISMO DE LAS AFLATOXINAS	9
2.4.	AFLATOXICOSIS EN ANIMALES	13
2.4.1.	Susceptibilidad a aflatoxinas	14
2.4.2.	Efectos tóxicos de las aflatoxinas en la avicultura	16
2.4.2.1.	Manifestaciones clínicas y lesiones patológicas	17
2.4.2.2.	Efecto de la aflatoxicosis en parámetros bioquímicos	18
2.4.2.3.	Trastornos renales de las aves	20
2.5.	SISTEMA URINARIO DE LOS POLLOS	23
2.5.1.	Anatomía del sistema urinario de los pollos	23
2.5.1.1.	Lóbulos renales	24
2.5.1.2.	La nefrona	25
2.5.1.3.	El glomérulo	25
2.5.1.4.	Los uréteres	26
2.5.1.5.	Irrigación	27
2.5.2.	Función renal en el pollo	29
2.5.2.1.	Filtración glomerular	29
2.5.2.2.	Reabsorción y secreción tubular	31
2.5.2.3.	Regulación del equilibrio de agua	32
2.5.2.4.	Manejo renal del sodio	33
2.5.2.5.	Manejo renal de potasio	35
2.5.2.6.	Manejo renal de calcio	36
2.5.2.7.	Manejo renal de fosfatos	36
2.5.2.8.	Excreción de productos metabólicos	37
2.5.2.9.	Excreción de xenobióticos	37
2.5.2.10.	Regulación de la presión arterial	38
2.5.2.11.	Otras funciones reguladoras	38
2.5.3.	Orina	39
2.5.3.1.	Características físicas de la orina de los pollos	39
2.5.3.2.	Fosfato, bicarbonato y equilibrio ácido-base	40
2.5.3.3.	Constituyentes nitrogenados	40
2.5.3.4.	Eliminación de la orina	41
2.5.4.	Parámetros de función renal en pollos	42
2.5.4.1.	Tasa de filtración glomerular	42
2.5.4.2.	Flujo sanguíneo renal (FSR)	42
2.5.5.	Depuración renal	43
2.5.5.1.	Depuración de inulina como indicador de la TFG	44
2.5.5.2.	Depuración del ácido p-aminohipúrico (PAH) como indicador del FPR.	46

Continuación.....

<b>Contenido</b>		<b>Página</b>
3.	HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	48
3.1.	HIPÓTESIS	48
3.2.	OBJETIVO GENERAL	48
3.3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	49
4.1.	LUGAR DE ESTUDIO	49
4.2.	MATERIAL BIOLÓGICO	49
4.3.	ELABORACIÓN DEL ALIMENTO CONTAMINADO	49
4.4.	PREPARACIÓN DEL MAÍZ CONTAMINADO CON AFLATOXINAS	50
4.5.	VARIABLES BAJO ESTUDIO	51
4.6.	MATERIALES PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS	52
4.7.	REACTIVOS	52
4.8.	EQUIPO UTILIZADO	52
4.9.	METODOLOGÍA PARA LA PRUEBA DE FUNCIÓN RENAL	54
4.9.1.	Procedimiento quirúrgico para el muestreo	54
4.9.2.	Hidratación y obtención de muestras de sangre y orina	55
4.9.3.	Registro de la presión arterial	56
4.9.4.	Obtención de curvas estándar para la cuantificación de analitos utilizados en la prueba función renal	57
4.10.	METODOLOGÍA PARA HISTOPATOLIGÍA Y ANÁLISIS BIOQUÍMICO	58
4.10.1.	Obtencion de muestras de riñones	48
4.10.2.	Técnica histológica para microscopía óptica	48
4.10.3.	Obtención de curvas estándar para la cuantificación de analitos utilizados en cuantificación de los parámetros bioquímicos	59
4.10.4	Cuantificación de glutatión reducido	60
4.10.5	Cuantificación de proteínas totales	61
4.10.6	Cuantificación de la actividad de las transferasas de glutatión	62
4.10.7	Cuantificación de transpeptidasa de $\gamma$ -glutamilo	62
4.11.	DISEÑO EXPERIMENTAL	63
4.13.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
5.	RESULTADOS	65
5.1.	PARÁMETROS FISICOS	65
5.1.1.	Peso corporal	65
5.1.2	Peso relativo de los riñones	65
5.2.	PARAMETROS DE FUNCIÓN RENAL	66
5.3.	PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	73
5.4	ESTUDIO HISTOPATOLOGICO	77
6.	DISCUSIÓN	81
7.	CONCLUSIONES	94
8.	GLOSARIO	97
9.	BIBLIOGRAFÍA	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Contenido	Página
2.1.	<i>Estructura química de las aflatoxinas primarias</i>	5
2.2.	<i>Vías de biotransformación y eliminación de la aflatoxina B<sub>1</sub> en humanos y aves</i>	10
2.3.	<i>Vista ventral de los órganos urinarios del pollo</i>	23
2.4.	<i>Diagrama de un lóbulo renal de pollo</i>	24
2.5.	<i>Micrografía electrónica de un glomérulo de pollo</i>	26
2.6.	<i>Irrigación venosa de los riñones de pollo</i>	29
2.7.	<i>Filtración, secreción y reabsorción de sustancias en la nefrona</i>	31
2.8.	<i>Manejo del agua por la nefrona</i>	33
2.9.	<i>Manejo de ácido p-aminohipúrico, inulina y glucosa por el riñón</i>	44
4.1.	<i>Registro de presión arterial de una gallina control</i>	56
4.2.	<i>Curvas estándar para la cuantificación de inulina, ácido p-aminohipúrico y fosfatos</i>	57
4.3.	<i>Curvas estándar para la cuantificación de Glutatión reducido, actividad específica de transferasa de glutatión y de Transpeptidasa de <math>\gamma</math>-glutamilo y proteínas totales en tejido renal</i>	60
5.1.	<i>Peso corporal de gallinas intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas y durante tres periodos de tiempo</i>	65
5.2.	<i>Peso relativo de los riñones de gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas y durante tres periodos de tiempo</i>	66
5.3.	<i>Tasa de filtración glomerular en gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas y durante tres periodos de tiempo</i>	70
5.6.	<i>Excreción fraccional de calcio en gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas y durante tres periodos de tiempo</i>	71
5.7.	<i>Excreción fraccional de sodio en gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas y durante tres periodos de tiempo</i>	72
5.8.	<i>Excreción fraccional de fosfatos en gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas y durante tres periodos de tiempo</i>	73
5.10.	<i>Concentración de proteínas totales en tejido renal de gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas y durante tres periodos de tiempo</i>	74
5.11.	<i>Concentración de glutatión reducido en tejido renal de gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas y durante tres periodos de tiempo</i>	75

Continuación.....

	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
5.12.	<i>Actividad específica de la enzima transferasa de glutatión en tejido renal de gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo</i>	76
5.13	<i>Actividad específica de la enzima transpeptidasa de <math>\gamma</math>-glutamilo en tejido renal de gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas y durante tres periodos de tiempo</i>	77



## ÍNDICE DE TABLAS

	Contenido	Página
2.1.	<i>Punto de fusión de las aflatoxinas</i>	6
2.2.	<i>Comparación de valores de dosis letal media oral (LD<sub>50</sub>) para AFB<sub>1</sub> en varias especies</i>	14
2.3.	<i>Intoxicaciones experimentales con AFB<sub>1</sub> en aves a diferentes dosis y periodos de exposición</i>	15
2.4.	<i>Osmolaridad de la orina de pollo bajo condiciones de deshidratación media y carga de sal</i>	39
2.5.	<i>Flujos de orina de pollo bajo condiciones específicas</i>	41
2.6.	<i>Valores promedio de depuración de inulina en pollos</i>	42
4.1.	<i>Distribución de tratamientos en las gallinas de postura sometidas a intoxicación crónica con aflatoxinas</i>	63
5.1.	<i>Análisis de la presión arterial media en gallinas</i>	67
5.2.	<i>Concentraciones plasmáticas de inulina, ácido p-aminohipúrico, sodio, potasio, calcio y fosfatos</i>	68
5.3.	<i>Flujo plasmático renal de gallinas control e intoxicadas</i>	69
5.4.	<i>Excreción fraccional de potasio de gallinas control e intoxicadas</i>	70

## 1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas producen un fuerte impacto en la salud humana y animal y además se estima que ocasionan importantes pérdidas económicas estimadas en millones de dólares. En la industria avícola varias micotoxinas representan un serio problema, y las que frecuentemente se han relacionado con la contaminación de los alimentos son las aflatoxinas, las ocratoxinas, los tricotocenos y la citrinina, siendo las primeras las más importantes debido a sus propiedades tóxicas y carcinogénicas. Los efectos más importantes producidos por aflatoxinas en avicultura es la mortalidad cuando se consumen en concentraciones muy altas, pero cuando éstos van de moderados a bajos y de manera crónica, ocasionan una reducción de la productividad debido al daño producido principalmente a nivel hepático, renal e inmunológico.

En gallinas de postura se ha demostrado que las aflatoxinas inducen una disminución de la cantidad y calidad en el huevo producido (Rizzi *et al.*, 2003), y aunque el organismo del animal logra inactivar una buena parte de la aflatoxina incluida en los granos, cuando las dosis de éstas son altas, las concentraciones de contaminación en el huevo rebasan los límites de detección y los límites máximos de tolerancia (Zaghini *et al.*, 2005). Esta contaminación puede tener especial significado para la salud pública al ser el huevo un producto de primera necesidad en México, y en el Estado de Aguascalientes, en el cual se tiene una producción anual de 8,926 toneladas. Adicionalmente, es necesario considerar que México es el cuarto productor mundial de huevo; la producción nacional es de 1'995,478 toneladas, con una tasa media de crecimiento anual de 3.3% en la producción y de 1.5 en el consumo, alcanzando a nivel nacional un consumo per cápita anual de 19.2 kg (INEGI, 2005).

Algunas evidencias bibliográficas señalan que en la aflatoxicosis existe daño en los riñones. Entre los cambios estructurales reportados, se encuentran: incremento

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

en el peso del riñón (Tung *et al.*, 1973; Huff *et al.*, 1986 y 1988; Quezada *et al.*, 2000); congestión de los sinusoides tubulares y degeneración del epitelio tubular (Asplin y Carnaghan, 1961; Newberne *et al.*, 1964); engrosamiento de la membrana basal del glomérulo (Valdivia *et al.*, 2001); poco desarrollo de estructuras del epitelio glomerular, cambios degenerativos en las células del túbulo contorneado proximal (Mollenhauer *et al.*, 1989). Mientras que las principales alteraciones funcionales identificadas se relacionan con disminuciones en la excreción del rojo de fenol (Tung *et al.*, 1973), el flujo urinario, la tasa de filtración glomerular, en la excreción fraccional de fósforo, sodio, potasio y la concentración plasmática del metabolito 1, 25 dihidroxi-colecalciferol, que se sintetiza en riñón, y es la forma más activa de la vitamina D<sub>3</sub>, así como el aumento en la excreción fraccional de calcio y la osmolaridad del plasma (Glahn *et al.*, 1990 y 1991).

Debido a la relevancia que tiene la aflatoxicosis en la salud pública, en la producción pecuaria y en la salud animal, se han realizado diversos estudios en el Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA. Particularmente, se ha profundizado en un modelo aviar, ya que éste reúne en cada experimento una factibilidad económica, validez estadística y representatividad del problema tal como ocurre en la realidad de México.

En este estudio se pretende intoxicar experimentalmente gallinas de postura Leghorn blancas de la línea Hy Line, las cuales recibirán alimento contaminado con AF durante 67 semanas. Durante el periodo de intoxicación se realizarán cinco muestreos a las semanas 0, 17, 42 y 67 para efectuar pruebas de funcionamiento renal y evaluar: la tasa de filtración glomerular, el flujo sanguíneo renal y el manejo renal de sodio, potasio, calcio y fosfatos. Se cuantificarán la concentración de proteínas totales, glutatión y la actividad enzimática específica de transferasa de glutatión y de la transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo en tejido renal. Adicionalmente se realizarán estudios histopatológicos en tejido renal.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. LAS MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por los hongos micotoxigénicos que colonizan naturalmente una gran variedad de materias primas y alimentos (sustratos) destinados al consumo humano y animal. Los hongos, en función del medio ambiente son capaces de producir las micotoxinas, además éstas constituyen un problema en el ámbito mundial por su alta incidencia y concentraciones de ocurrencia en los alimentos para humanos y animales. Los hongos son especies biológicas de gran ubicuidad por lo que son habitualmente saprofitos del suelo, agua y aire (Duarte y Villamil, 2006).

Los hongos micotoxigénicos pueden desarrollarse en gran variedad de productos agrícolas, pudiendo contaminarlos cuando éstos son cultivados, procesados, transformados o almacenados en condiciones que favorezcan su desarrollo. La FAO (1993) reporta que al estar presentes en los productos agrícolas, altera su textura, sabor y color, así como también la calidad de los mismos.

El crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas dependen de muchos factores como el sustrato, la temperatura, el pH, la humedad relativa y la presencia de microflora competidora. Las toxinas son producidas por los hongos bajo condiciones de estrés provocado por el medio ambiente o bien por una lucha química contra competidores de sustratos (Duarte y Villamil, 2006); su presencia varía de acuerdo al área geográfica donde se desarrolla el hongo (Bilgrami y Sinha, 1986).

Bennett y Klich, (2003) reportan que existen más de 300 de micotoxinas que están implicadas en la contaminación de alimentos, además de ser potencialmente tóxicas para el hombre y los animales (Jand *et al.*, 2005), siendo las más

frecuentes: las aflatoxinas, la zearalenona, la ocratoxina, la citrinina, la patulina, el ácido penicílico y el alcaloide del ergot (FAO, 2003).

Se ha reportado que la incidencia natural de Aflatoxinas (AF) en los alimentos se encuentra influida por el clima de tal forma que, prácticamente, todos los países tropicales tienen el problema de la contaminación con AF, donde las condiciones ambientales favorecen la reproducción de los hongos, y por lo tanto, la producción de este compuesto (Bilgrami y Sinha, 1986; FAO, 1993), sin embargo, también pueden producirse en zonas más templadas y ocasionalmente se producen también bajo condiciones pobres de crecimiento fúngico (FAO, 1993).

El rango de temperatura límites para la producción de AF a partir de *A. flavus* y *A. parasiticus* se encuentra entre 12 y 41° C, pero su producción óptima ocurre entre los 25 y 32° C, mientras que en los forrajes su producción se incrementa con una temperatura por encima de 27° C, humedad relativa de más del 62% y un 14% de humedad en el forraje (Agag, 2004).

La interrelación entre el hongo, el huésped (planta) y el ambiente, es lo que ocasiona la contaminación, por esta razón es necesario su conocimiento si se desea prevenir la contaminación con AF en el campo. Algunas prácticas culturales pueden influir estas interrelaciones reduciendo la incidencia de las mismas (Resnik, 1994; Graham, 1982). El adecuado manejo de los rastrojos, fuente primaria de los hongos, es una de las acciones preventivas para el logro de la reducción de la contaminación. En la práctica, la rotación de cultivos tiene el mismo objetivo (Resnik, 1994).

## **2.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LAS AFLATOXINAS**

Las AF son un grupo de compuestos químicos relacionados estructuralmente, que conforman una familia de cumarinas que poseen un anillo bifurano unido a un núcleo de cumarina con un anillo pentanona (aflatoxina B) o un anillo de lactona (aflatoxina G), y se denominan como B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> debido a la fluorescencia en color azul que producen bajo luz ultravioleta y las G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> que corresponden al color

verde, los subíndices indican la movilidad cromatográfica relativa (Bogantes *et al.*, 2004; Peraica *et al.*, 1999, figura 2.1).

Se han descrito como AF primarias las B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> y son producidas por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Streptomyces* (Agag, 2004), los cuales se encuentran distribuidos a nivel mundial. El *A. parasiticus* produce las cuatro AF primarias, aunque su distribución es más limitada, mientras que *A. flavus* solamente produce las B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (IARC, 2002).

Dentro del grupo de las AF, la de mayor importancia en salud pública es la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), ésta se relaciona con el desarrollo de carcinoma hepatocelular en poblaciones que consumen alimentos contaminados (CAST, 2003). Su mecanismo de acción tóxica, involucra la formación de aductos entre uno de sus metabolitos, un epóxido producido en el hígado luego de la ingestión de la toxina, con el ADN de las células de las aves, causando alteraciones en su replicación (Wild y Turner, 2002; Mela *et al.*, 2002) y está clasificada dentro del grupo I por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) debido a su efecto carcinogénico en los humanos y los animales y se considera como el carcinogénico natural más potente que se conoce.

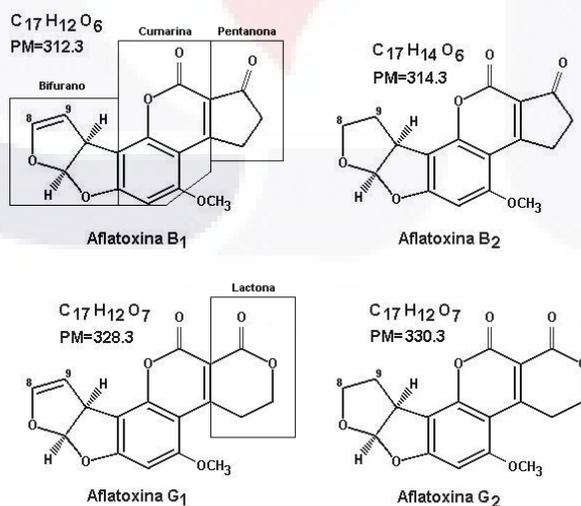


Figura No. 2.1. Estructura química de las aflatoxinas primarias (De Luna, 2010).

Las AF son moléculas muy estables, requieren de temperaturas muy altas para alcanzar su descomposición (punto de fusión; tabla No. 2.1). Son insolubles en solventes no polares, poco solubles en agua (10-30 µg/mL) y fácilmente solubles en compuestos orgánicos moderadamente polares como el cloroformo, el metanol y el dimetilsulfóxido (Cole y Cox, 1981). Son inestables a la luz ultravioleta en presencia de oxígeno, los pH extremos (<3, >10) las inactivan, dado que valores arriba de 8 y por abajo de 4 rompen las lactonas que confieren la típica fluorescencia de las AF y reduce su toxicidad y carcinogenicidad (Dollear, 1969), así como también los agentes oxidantes. La IARC (1993) reporta que son degradables en soluciones que contengan amonía o hipoclorito de sodio.

*Tabla No. 2.1. Punto de fusión de las aflatoxinas*

Tipo de aflatoxina	Punto de fusión (°C)
AFB <sub>1</sub>	268-269
AFB <sub>2</sub>	287-289
AFG <sub>1</sub>	244-246
AFG <sub>2</sub>	237-239
AFM <sub>1</sub>	299

*Tomado de Martínez, 2003*

### **2.2.1. Importancia de las micotoxinas en la avicultura**

En la actualidad, las micotoxinas se consideran como una de las principales amenazas para la producción pecuaria debido a la capacidad que tienen para acumularse durante la producción de varios de los insumos para la alimentación de los animales, como el maíz, la semilla de algodón, el sorgo y los forrajes, principalmente. Recientemente, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación ha estimado que alrededor del 25% de la producción agrícola que es destinada a alimentos está contaminada con micotoxinas (FAO, 2003).

En la avicultura, las principales micotoxinas que se han relacionado con la contaminación de alimentos son: aflatoxinas, ocratoxinas, tricotricos, citrinina,

estigmatocistina, fumonisinas y zearalenona (Jand *et al.*, 2005), siendo las aflatoxinas (AF) las más tóxicas y carcinogénicas aún en muy pequeñas cantidades (Wogan, 1992). En el caso del maíz, un 78% de las muestras se encontraron contaminadas con AFB<sub>1</sub> (Jand *et al.*, 2005).

Se ha observado que uno de los efectos más fehacientes es la mortalidad cuando hay consumo de alimentos con altas concentraciones ( $> 800 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ ) de aflatoxinas, pero cuando las concentraciones son bajas o moderadas (200-800  $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ ) y la exposición ocurre durante un periodo considerable de tiempo, se produce una disminución de la producción debido a la reducción en la velocidad de crecimiento, reproducción y calidad de los productos, lo que provoca severas pérdidas económicas para los productores (Jand *et al.*, 2005).

### **2.2.2. Aflatoxinas en insumos para la alimentación animal**

Las AF han sido encontradas en muchos productos vegetales como son: maíz, sorgo, arroz, trigo, cebada, mijo, avena, harinas de maíz y sorgo, copra, cacahuate, nueces, semillas de algodón, girasol y soya (Moreno, 1989). Esta contaminación ocurre cuando, por circunstancias especiales, estos productos agrícolas no pueden ser secados dentro de las primeras 48 horas después de su cosecha (FAO, 1980; Sanchis *et al.*, 1988; Abarca *et al.*, 1994).

Los granos y semillas son los principales ingredientes en la elaboración de alimentos para las aves, y cuando se contaminan con AF representa un serio problema para la inocuidad alimentaria en los animales. Los estudios realizados por Dale *et al.* (1980); Rosiles y Pérez (1981) caracterizaron el grado de contaminación con AFB<sub>1</sub> en muestras de alimentos para los animales domésticos, encontraron que la AFB<sub>1</sub> estaba presente en el 34% de los alimentos elaborados para aves, el 36% y el 19% de los alimentos para bovinos y cerdos respectivamente. Estudios recientes también en alimentos para aves muestran que las concentraciones de aflatoxinas van desde 5 ppb en España (Zinedine *et al.*, 2007) hasta 61 y 80 ppb en Brasil y México respectivamente (Fraga *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2006). En la región central de México se han detectado

concentraciones importantes de micotoxinas en alimentos para los animales (Ortiz *et al.*, 1994).

### **2.2.3. Análisis de las aflatoxinas**

En 1981, el límite máximo para la AF en los alimentos ( $AFB_1$  o la suma de las aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$ ) varió desde la no detección hasta 20 mg/kg de alimento (Jewers, 1987). A medida que en ciertos países se han venido estableciendo límites mínimos de AF en los alimentos, se ha tenido la necesidad de mejorar la precisión de los métodos empleados para su cuantificación. El análisis de las AF en productos agrícolas actualmente se lleva a cabo por tres tipos de pruebas:

- La prueba presuntiva, que inclusive puede llevarse a cabo en el campo para determinar si se debe o no de analizarse el grano para determinar la presencia de AF.
- Las pruebas rápidas de escrutinio para establecer la ausencia o presencia de AF.
- Los métodos analíticos para determinar en forma precisa el nivel de contaminación con AF (Moreno, 1989).

En 1993, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) en sus monografías sobre la evaluación de carcinógenos para humanos, tras la realización de varios estudios experimentales emitió las siguientes conclusiones:

- Existe evidencia suficiente de que la mezcla natural de AF es carcinogénica para los humanos.
- Existe evidencia suficiente de que la  $AFB_1$  por sí sola es carcinogénica para los humanos.
- Existe evidencia inadecuada de que la  $AFM_1$  sea carcinogénica para los humanos.

- Hay evidencia suficiente de que la mezcla natural de aflatoxinas, las AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub> sea carcinogénica en animales experimentales.
- Existe evidencia limitada de que la AFB<sub>2</sub> sea carcinogénica en animales experimentales.
- Existe evidencia inadecuada de que la AFG<sub>2</sub> sea carcinogénica en animales experimentales.

Por lo anterior, la AFB<sub>1</sub> está ubicada dentro del grupo I (uno), dado que son carcinogénicas para los humanos, mientras que la AFM<sub>1</sub> es clasificada en el grupo II (dos) debido a que existe la posibilidad de que pueda producir cáncer en el humano.

En comparación con la AFB<sub>1</sub> la toxicidad de las aflatoxinas B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> es aproximadamente 50, 20 y 10% respectivamente, de acuerdo a estudios de comparación realizados con varias especies animales. (Agag, 2004).

### **2.3. METABOLISMO DE LAS AFLATOXINAS**

La capacidad toxicogénica de las aflatoxinas está establecida por una secuencia de fenómenos que comprenden la administración, la absorción, la biotransformación, su farmacocinética, sus interacciones moleculares, su distribución y la excreción de la toxina, así como los metabolitos producidos; su importancia se considera una vez que se demuestra la capacidad que tiene para producir efectos relevantes sobre la salud de las personas y la productividad de los animales (FAO, 2003).

Como puede apreciarse en la figura 2.2, la ruta principal de exposición a las aflatoxinas es la vía oral y son introducidas al organismo cuando se consume alimento contaminado. Como es una molécula de peso molecular relativamente bajo y lipofílica, son absorbidas eficientemente en la porción duodenal del intestino delgado por difusión pasiva y presentan un alto índice de absorción (Kumagai, 1989), mientras que una pequeña cantidad (5%) es eliminada en las heces.

Después de la absorción, la AFB<sub>1</sub> se distribuye por vía sanguínea, y la unión de este xenobiótico a las proteínas del plasma afecta su biodisponibilidad, mientras que la porción libre está disponible para pasar a través de las membranas capilares (Hsieh y Wong, 1994).

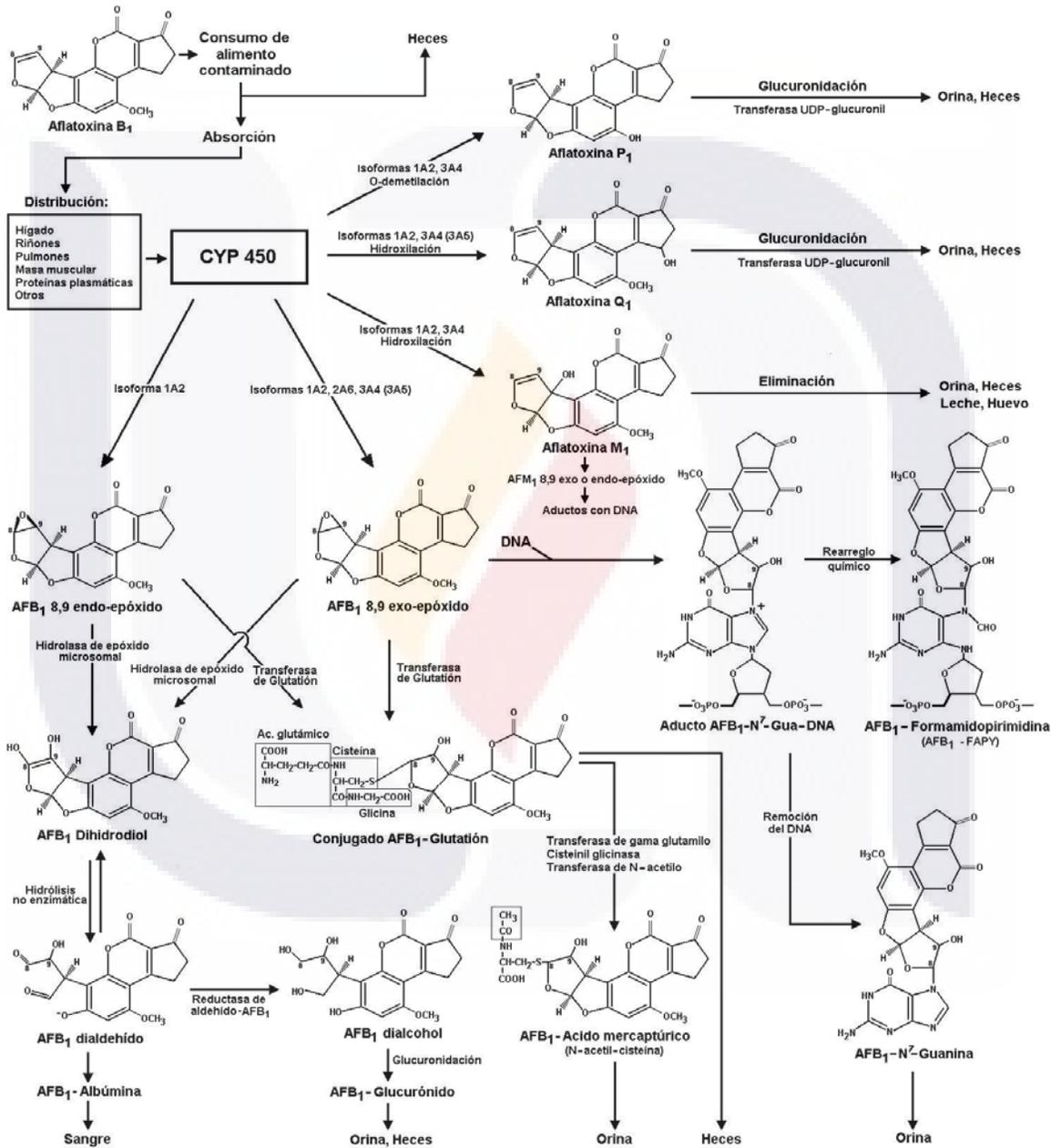


Figura 2.2. Vías de biotransformación y eliminación de la aflatoxina B<sub>1</sub> en humanos y aves Cortez et al., 2010).

La AFB<sub>1</sub> es concentrada principalmente en el hígado, favoreciendo a esta acción la alta permeabilidad de la membrana del hepatocito hacia el tóxico y su unión covalente con las macromoléculas hepáticas (Busby y Wogan, 1984); en los riñones también es retenida pero en menor grado (Hayes *et al.*, 1977; Hsieh y Wong, 1994). Los pulmones, masa muscular y otros órganos también la contienen aunque en cantidades todavía menores.

La AFB<sub>1</sub> en sí misma es relativamente inocua (Guengerich *et al.*, 2002), pero una vez que es ingerida por un organismo es biotransformada a su forma tóxica (Kamdem *et al.*, 2006). En mamíferos, el metabolismo hepático es el factor principal que condiciona la concentración de la toxina en la circulación, aunque también existen sitios extrahepáticos con potencial metabólico, por ejemplo, riñones, pulmones, intestinos y piel (Henderson *et al.*, 2000).

Por acción de un grupo de enzimas del sistema de monooxigenasas de función mixta formado por varias isoformas del citocromo P<sub>450</sub> (CYP<sub>450</sub>) el cual es la reacción de defensa principal contra agentes tóxicos (Henderson *et al.*, 2000), siendo las isoformas CYP1A2 y CYP3A4 las enzimas responsables del metabolismo de la AFB<sub>1</sub> (Essigmann *et al.*, 1982; Forrester *et al.*, 1990; Omiecinski *et al.*, 1999). Estas enzimas adicionan un grupo funcional a la AFB<sub>1</sub> produciendo unos compuestos hidroxilados denominados aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), aflatoxina Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>) y el metabolito demetilado aflatoxina P<sub>1</sub> (AFP<sub>1</sub>). Éstos son poco genotóxicos comparados con la AFB<sub>1</sub> y en humanos se consideran de manera general como productos de la desintoxicación (Raney *et al.*, 1992).

Una parte de la AFM<sub>1</sub> es eliminada sin modificaciones por heces, orina, leche (Oliveira *et al.*, 2007) y en aves por medio del huevo (IARC, 2002) o puede continuar una activación más a fondo y formar un AFM<sub>1</sub>-8,9-epóxido que forma aductos con el DNA y posteriormente ser excretado en la orina en forma de AFM<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina (Egner *et al.*, 2003).

Por otro lado, la AFB<sub>1</sub> puede estar sujeta a un metabolismo oxidativo de fase I por las isoformas 1A2 o 3A4 formándose un epóxido entre los carbonos 8 y 9 en el

anillo furano terminal denominado epóxido 8,9-AFB<sub>1</sub>, presentando dos formas estereoméricas: el exo y el endo-epóxido (Johnson y Guengerich, 1997; Wang *et al.*, 2000).

Una de las rutas del metabolismo de los epóxidos de AFB<sub>1</sub> es la de ser transformados por la hidrolasa de epóxido microsomal en AFB<sub>1</sub>-dihidrodiol, para posteriormente, por hidrólisis no enzimática, realizarse la apertura del anillo furano terminal y formarse el AFB<sub>1</sub>-dialdehído, el cual tiene la capacidad de reaccionar con grupos amino de lisina para formar aductos con proteínas (Sabbioni *et al.*, 1987) o puede ser parcialmente reducido a monoalcoholes o completamente reducido a dialcohol por la reductasa de aldehído-AFB<sub>1</sub> (Guengerich *et al.*, 2001).

Posteriormente, las reacciones enzimáticas conjugan el xenobiótico modificado con otra sustancia, como el ácido glucurónico o el glutatión. Los productos conjugados son moléculas más grandes que el substrato y son generalmente polares y así pueden ser excretados fácilmente del cuerpo.

La desintoxicación de AFB<sub>1</sub> se logra mediante la conjugación de los metabolitos hidroxilados AFQ<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> con ácido glucurónico, reacción enzimática efectuada por la transferasa UDP-glucuronil para formar ésteres solubles del glucurónido que se excretan en orina o bilis. Los epóxidos de AFB<sub>1</sub> son conjugados con el glutatión reducido en una reacción catalizada por la enzima transferasa de glutatión citosólica (GST; Neal *et al.*, 1987), son metabolizados en ácido mercaptúrico (N-acetilcisteína) con intervención de las enzimas transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo, cisteinil glicinasa y transferasa de N-acetilo. El ácido mercaptúrico es eliminado por vía urinaria (Scholl *et al.*, 1997).

La genotoxicidad de la AFB<sub>1</sub> radica solamente en el exo-epóxido, el cual reacciona con DNA formando un aducto en la posición N<sup>7</sup> de la guanina con unión covalente en el C8 del epóxido de AFB<sub>1</sub>. Este aducto se le ha identificado como trans- 8,9-dihydro -8- (N<sup>7</sup>-guanil)- 9- hydroxy- AFB<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>- N<sup>7</sup>- Gua- DNA) (Johnson y Guengerich, 1997)

La presencia del aducto crea una carga positiva en el anillo imidazol de la guanina, lo que da lugar a cualquiera de las dos reacciones siguientes: por ser relativamente inestable dentro de la estructura del DNA, la mayoría de los aductos (AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua) se separan del DNA y se excretan exclusivamente por la orina en un período de 7.5 horas (Wang y Groopman, 1999), o bien, ocurre un cambio químico en el cual el anillo imidazol se abre para formar la estructura de AFB<sub>1</sub>-formamidopirimidina (AFB<sub>1</sub>-FAPY) que es biológico y químicamente más estable (Lin *et al.*, 1977). Si estos aductos de DNA o los sitios apurínicos que permanecen desde la separación espontánea del aducto AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua no son reparados, pueden finalmente conducir a eventos mutacionales.

Las AF tienden a infiltrarse en la mayor parte de tejidos blandos y grasos de los pollos. Estudios realizados en pollos a los que se les administró marcadores de AF han demostrado que éstas, al igual que sus metabolitos, son eliminadas principalmente por la bilis y en menor grado por tracto gastrointestinal y riñón. En cuanto al tiempo de eliminación, estudios hechos con gallinas White Leghorn indicaron un 28 % de excreción de aflatoxina en las primeras 24 horas después de administrarles la toxina vía oral y una eliminación del 70% en siete días (Agag, 2004); otros estudios en gallinas ponedoras a las que se les administró marcadores de AF han indicado altas concentraciones en hígado (Rizzi *et al.*, 2003) y en huevo (Oliveira *et al.*, 2000).

#### **2.4. AFLATOXICOSIS EN ANIMALES**

Algunos de los efectos adversos ocasionados por el consumo de alimentos contaminados con micotoxinas se reflejan en una baja producción de los animales, que se manifiesta con la disminución del crecimiento y baja eficiencia alimentaria debido a que las toxinas interfieren con procesos enzimáticos encargados de la digestión y metabolismo de nutrientes (Requena *et al.*, 2005), mientras que en humanos existe el consumo de pequeñas dosis de manera crónica representando un problema para la salud pública.

### 2.4.1. Susceptibilidad a aflatoxinas

La susceptibilidad de las aves a AF varía entre las especies, las razas y hasta en las líneas genéticas. Estudios toxicológicos comparativos entre especies han demostrado que los patos y los pavos son los más susceptibles a la aflatoxicosis, en el caso de los pavos su extrema sensibilidad se debe a que existe una deficiente detoxificación mediada por las enzimas transferasas de glutatión, reguladoras de la concentración de epóxidos de AF en el organismo animal (Klein *et al.*, 2003). La AFB<sub>1</sub> es la aflatoxina con mayor capacidad tóxicogénica (LD<sub>50</sub>, 1-50 mg/kg peso corporal) para una gran variedad de especies animales, como puede observarse en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Comparación de valores de dosis letal media oral (LD<sub>50</sub>) para AFB<sub>1</sub> en varias especies

Especie	Edad / Peso	LD <sub>50</sub> (mg/kg pc)	Referencia
Patos	1 día	0.37	Wogan, 1965
Gatos	Nd	0.55	Jones y Jones, 1969
Cerdos	6 - 7 kg	0.62	Jones y Jones, 1969
Pavos	Nd	0.5 - 1.0	Wogan, 1966 y 1969
Perros	Cachorros	0.5 - 1.0	Newberne y Butler, 1969; Butler, 1874
Bovinos	Becerros	0.5 - 1.0	Wogan, 1966 y 1969
Cerdo de Guinea	Nd	1.4 - 2.0	Newberne y Butler, 1969; Wogan, 1966 y 1969
Conejos	Nd	0.3 - 0.5	Jones y Jones, 1969; Newberne y Butler, 1969
Caballos	Jóvenes	2.0	Wogan, 1966 y 1969
Ovinos	Jóvenes	2.0	Armbrecht <i>et al.</i> , 1970
Changos	Jóvenes	2.2	Rao y Gehring, 1971
Pollos	Jóvenes	6.5 - 16.5	Smith y Hamilton, 1970
Ratones	Jóvenes	9.0	Jones y Jones, 1969
Hámster	Jóvenes	10.2	Jones y Jones, 1969
Ratas macho	21 días	5.5	Butler, 1964
Ratas hembras	Nd	7.4	Butler, 1964
Ratas machos	100 g	17.9	Butler, 1964

(Agag, 2004). Nd = no disponible

Se ha reportado que los ansares, codornices y faisanes son más sensibles que los pollos (Agag, 2004; Essiz *et al.*, 2006).

Se han realizado considerables investigaciones donde se han utilizado diferentes concentraciones de AF y generalmente por periodos cortos de intoxicación, para buscar evidencias de los efectos negativos que producen las AF sobre la salud y los parámetros productivos en aves, sin embargo, a nivel de campo la exposición crónica es más común que la aguda, pero también más difícil de identificar. Los detalles de esas investigaciones se pueden apreciar más detalladamente en la tabla 2.3, a partir de la cual nos podemos dar cuenta que son muy pocas las investigaciones realizadas con intoxicaciones crónicas experimentales en aves.

*Tabla 2.3. Intoxicaciones experimentales con AFB<sub>1</sub> en aves a diferentes dosis y periodos de exposición*

Especie	Periodo	Dosis (mg/kg de alimento)	Fuente
Patos	11 d	3.0	Bintvihok <i>et al.</i> , 2002
	10 d	2.0	Glahn <i>et al.</i> , 1990
	33 d	0.05 y 0.20	Tessari <i>et al.</i> , 2006
Pollos	3 sem	0.25	Khan <i>et al.</i> , 1990
		4.0	Edrington <i>et al.</i> , 1997
		3.5	Kubena <i>et al.</i> , 1997
		4.0	Ledoux <i>et al.</i> , 1999
		3.0	Valdivia <i>et al.</i> , 2001
		5.0	Pimpukdee <i>et al.</i> , 2004
	5 sem	5.0	Okotie-Eboh <i>et al.</i> , 1997
		1.0 y 2.0	Jansen van Rensburg <i>et al.</i> , 2006
	6 sem	1.0 y 2.0	Allameh <i>et al.</i> , 2005
		0.05 y 0.10	Ortatatli <i>et al.</i> , 2005
0.07		Arrieta <i>et al.</i> , 2006b	
0.35		Del Río <i>et al.</i> , 2006	
Codornices	20 sem	3.0	Morbini <i>et al.</i> , 2006
		2.5	Essiz <i>et al.</i> , 2006
Pavos	Nd	0.05 y 0.20	Oliveira <i>et al.</i> , 2007
		1.0	Coulombe <i>et al.</i> , 2005
Gallinas de postura	11 d	3.0	Bintvihok <i>et al.</i> , 2002
	4 sem	2.5	Rizzi <i>et al.</i> , 2003
	4 sem	2.5	Zaghini <i>et al.</i> , 2005
	52 sem	0.50	Kim <i>et al.</i> , 2003

*Nd = no disponible*

*Tomado de De Luna (2010)*

#### 2.4.2. Efectos tóxicos de las aflatoxinas en la avicultura

Las aves de corral están expuestas al consumo de alimentos elaborados con materias primas contaminadas con una gran variedad de micotoxinas, entre ellas las AF, las cuales no pueden ser eliminadas por procesos implicados en la elaboración de alimentos, por ejemplo el peletizado, mediante los cuales puede eliminarse el hongo que las produce pero no sucede lo mismo con las AF debido a su propiedad termoestable (Arrieta *et al.*, 2006b).

Además el riesgo se incrementa debido a la presencia de interacciones sinérgicas con otras micotoxinas (Aravind *et al.*, 2003) y agentes infecciosos (Tessari *et al.*, 2006), afectando la calidad y disponibilidad de productos y por tanto su comercialización (Bennett y Klich, 2003). La aflatoxicosis puede clasificarse como aguda o crónica y tanto el tipo de manifestación como su carcinogenicidad, están en función de la concentración de AF ingerida (Zaghini *et al.*, 2005), duración de la exposición a esta toxina y la eficiencia del metabolismo para eliminarla en forma de compuestos menos tóxicos.

En la industria avícola, la toxicidad aguda de las AF presenta un curso rápido con manifestaciones usualmente obvias (Bennett y Klich, 2003), siendo la mortalidad el principal efecto producido por el consumo de alimentos con altas concentraciones de AF (1-5 mg/kg de alimento), mientras que el consumo de concentraciones bajas o moderadas (50 y 100 ppb) de manera crónica (Ortatatli *et al.*, 2005) el efecto se ve reflejado en una disminución de los índices de productividad de las aves como viabilidad, incubabilidad del huevo, consumo y conversión de alimento (Pimpukdee *et al.*, 2004).

Diferentes estudios realizados en pollos han demostrado que cuando éstos consumen dietas con cantidades muy altas de AF (1-2 mg/kg de alimento), se presenta una disminución en el consumo de alimento y simultáneamente una reducción en la ganancia de peso (Allameh *et al.*, 2005); además se ha confirmado que las AF, principalmente AFB<sub>1</sub>, afectan negativamente el desempeño de los pollos (Morbini *et al.*, 2006), al observarse una disminución en el índice de

conversión alimenticia (Del Río *et al.*, 2006). En lo que respecta a gallinas de postura, se ha documentado que el consumo de alimento con concentraciones de AF superiores a los permitidos (30 ppb) ocasionan una drástica y repentina caída en la producción de huevo debido principalmente a una reducción en la síntesis y transporte de precursores de la yema a nivel hepático (Jand *et al.*, 2005). También se ha reportado importantes efectos negativos en la calidad del huevo (Zaghini *et al.*, 2005), pues se han encontrado alteraciones en el peso del cascarón y en el color de la yema en gallinas alimentadas con 2.5 mg/kg de alimento de AFB<sub>1</sub>, donde la variación en el color probablemente se atribuye a la interferencia de éstas con el metabolismo de lípidos y en la deposición de pigmentos en la yema.

**2.4.2.1. Manifestaciones clínicas y lesiones patológicas.** Tanto intoxicaciones naturales como experimentales con AF en pollos y gallinas de postura se han observado numerosas manifestaciones que incluyen ataxia, parálisis de piernas, (Jand *et al.*, 2005), disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso (Khan *et al.*, 1990), disminución en la calidad y cantidad de huevo producido, (Rizzi *et al.*, 2003), postración y muerte (Bennett y Klich, 2003).

Numerosos estudios han demostrado que la intoxicación con esta micotoxina repercute negativamente en la estructura y funcionamiento de sistemas y órganos al referir una gran variedad de lesiones a nivel macroscópico y microscópico, con lo cual se permite clasificarla como un agente inmunosupresor (Tessari *et al.*, 2006), hepatotóxico (Jansen van Rensburg *et al.*, 2006), nefrotóxico (Glahn *et al.*, 1990), teratogénico, mutagénico (Goldman y Shields, 2003) y cancerígeno (IARC, 1993). Sin embargo, el principal órgano blanco es el hígado y algunos de los daños producidos son hígado graso y pálido, necrosis moderada y extensiva y hemorragias, además de alargamiento de la vesícula (Agag, 2004), así como un incremento en el peso relativo (Edrington *et al.*, 1997) y apariencia friable (Allameh *et al.*, 2005). Microscópicamente, se incluyen hallazgos como esteatosis microvesicular severa, proliferación de conductos biliares, degeneración de hepatocitos con reordenamiento pseudoacinar y múltiples focos de infiltración de linfocitos (Valdivia *et al.*, 2001), además de hiperplasia biliar difusa (Coulombe *et*

al., 2005), de acuerdo a estudios realizados en periodos cortos de tiempo, mientras que estudios con intoxicaciones crónicas en pollos de engorda han indicado la presencia de hepatocitos basófilos, vacuolados y regenerativos, fibrosis del tejido y células inflamatorias en zonas portales (Arrieta *et al.*, 2006b). También se han observado residuos de AF, libres y conjugadas, en hígado de pollos y gallinas (Bintvihok *et al.*, 2002).

Los riñones también son afectados de manera importante, ya que se ve afectado por la necesidad de mantener la homeostasis de los medios extra e intracelular a través del equilibrio electrolítico y la eliminación de residuos tóxicos acumulados como productos del metabolismo. Durante la intoxicación con AFB<sub>1</sub> en pollos, hay evidencias que indican alteraciones funcionales como disminución del flujo urinario, de la tasa de filtrado glomerular y de la excreción del rojo de fenol (Tung *et al.*, 1973). Entre los daños estructurales reportados son incremento en el peso del riñón (Quezada *et al.*, 2000), congestión de los sinusoides tubulares y degeneración del epitelio tubular, engrosamiento de la membrana basal del glomérulo y cambios degenerativos en las células del túbulo contorneado proximal (Ledoux *et al.*, 1999). Al igual que en hígado, Tessari *et al.* (2006) reportaron degeneración hidrópica a nivel renal en pollos.

En base a lo anterior, el daño ocasionado por AF en los órganos trae como consecuencia variaciones en los parámetros bioquímicos, ya que pueden afectar la energía, carbohidratos y lípidos como también el metabolismo del ácido nucleico y proteínas, además de producir alteraciones en diversas funciones enzimáticas (Sampaio *et al.*, 2004).

**2.4.2.2. Efecto de la aflatoxicosis en parámetros bioquímicos.** Es importante pues, tomar en cuenta la valoración de los parámetros bioquímicos, ya que son importantes para el diagnóstico de aflatoxicosis debido a las variaciones significativas que producen en la actividad enzimática relacionadas con el funcionamiento hepático, entre ellas se encuentran la alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT). Se ha

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

observado una correlación en las variaciones de los niveles séricos de las enzimas hepáticas, donde principalmente se produce un incremento en los niveles de enzimas séricas ocasionados por disfunción hepática como consecuencia de ruptura de hepatocitos, resultado de necrosis o alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular (Borsa *et al.*, 2006).

Los resultados de algunos ensayos realizados en pollos de engorda, han indicado que concentraciones bajas de AFB<sub>1</sub> (70 ppb) por periodos largos de exposición (42 días) producen una alteración en la síntesis de proteínas ocasionando una disminución en la actividad sérica de AST (Arrieta *et al.*, 2006a). Otros estudios, también han reportado una disminución significativa de AST acompañado de lesiones histopatológicas hepáticas (Arrieta *et al.*, 2006b), mientras que para la actividad de ALT también se ha indicado una disminución de su actividad al usar concentraciones de 3.0 mg de AFB<sub>1</sub> / kg de alimento (Valdivia *et al.*, 2001). Otros investigadores (Allameh *et al.*, 2005) han reportado que el consumo de alimento con 1.0 y 2.0 mg/kg de alimento de AFB<sub>1</sub> en la dieta de pollos, producen un incremento de la actividad de AST, por lo que los cambios son dependientes de la concentración y duración de la exposición de la toxina. Mientras que ensayos realizados en pollos intoxicados con dietas que contenían 5 mg/kg de alimento de AF, han reportado un incremento de la actividad enzimática sérica de la GGT, (Okotie-Eboh *et al.*, 1997), dicho incremento puede atribuirse a la hiperplasia biliar producida por la toxina (Kim *et al.*, 2003), por lo que esta enzima se considera como un indicador de daño hepático en este tipo de intoxicación (Jansen van Rensburg *et al.*, 2006).

El incremento de la actividad enzimática de la GGT se produce a causa de procesos patológicos sobre algunos órganos, como el hígado y los riñones (Ramaiah, 2007). Debido al daño ocasionado por las AF en la estructura de las células hepáticas y renales, se produce ruptura de la membrana celular y en consecuencia la liberación de esta enzima a la circulación sanguínea o a la orina, es por eso que la evaluación de la actividad de GGT a nivel de plasma y orina también es posible (Kim *et al.*, 2003).

En relación con las proteínas plasmáticas (Kubena *et al.*, 1997) y hepáticas, Valdivia *et al.*, (2001), al comparar con el grupo control, encontraron concentraciones muy bajas de éstas en pollos, dichos resultados coinciden con los reportados por otros investigadores (Ledoux *et al.*, 1999), lo cual pudiera constituirse como una de las primeras evidencias diagnósticas del daño originado por la exposición a aflatoxinas.

**2.4.2.3. Transtornos renales de las aves.** Los trastornos renales que presentan las aves sobre todo son secundarios a otras enfermedades o problemas, pueden ser categorizados como infecciosos y no infecciosos. Entre ellas se pueden mencionar los defectos congénitos (atrofia, hipotrofia e hipoplasia congénita), deposición de grasa dentro de los túbulos renales, las insuficiencias renales aguda y crónica, la amiloidosis, la nefrosis, las nefropatías inducidas por toxina y la nefritis.

Los defectos congénitos como la ausencia completa de los riñones se han reportado, pero conduce a la muerte embrionaria temprana (Waters, 1943). Hipoplasia con hipertrofia compensadora de las partes intactas se puede encontrar con más frecuencia (Tudor, 1979). Los signos clínicos se pueden encontrar sólo si una gran parte del riñón es disfuncional.

La atrofia o hipotrofia debe diferenciarse de la hipoplasia congénita. Los riñones hipotróficos se pueden encontrar en las aves con ascitis, oviductos afectados o huevos desplazados, donde la presión sobre estos órganos se incrementa. La atrofia renal puede bloquear el uréter (Tudor, 1979). Los signos clínicos se producen cuando las partes hipertróficas no puede compensar la pérdida de función.

Muy conocido en las aves de corral es la deposición de grasa dentro de los túbulos renales como consecuencia de la lipemia, la influencia de tóxicos y la falta de energía o de oxígeno (Tudor, 1979; Siller, 1981).

La insuficiencia renal aguda y la anuria son a menudo causadas por un shock y suelen, ser reversible, mientras que la insuficiencia renal crónica puede ser causada por agentes nefrotóxicos, por la deshidratación crónica y por la obstrucción de los ureteres. Los signos clínicos a menudo se desarrollan de manera tardía. Se reportan signos inespecíficos como anorexia, vómitos y letargo (Lumeij, 1994).

La amiloidosis ha sido asociada (Robbins, 2006) con la acumulación de proteínas fibrilares patogénicas en los riñones y otros órganos, reunidas en una conformación terciaria insoluble, por exceso de síntesis o por resistencia al catabolismo. A medida que el material se acumula, produce atrofia por presión del parénquima adyacente. La amiloidosis da lugar a alteraciones potencialmente mortales. Se ha encontrado en un 40% de las glomerulonefritis (GN) crónicas, donde la sustancia amiloide se deposita en los glomérulos y en las paredes vasculares produciendo proteinuria intensa, y finalmente desarrolla una nefropatía terminal. En los hallazgos macroscópicos los riñones pueden estar de tamaño normal o algo agrandados (Robbins, 2006). La amiloidosis también se ha indicado que se produce como una respuesta secundaria a una enfermedad crónica o procesos destructivos de tejido (Maxie, 2007).

La deposición de material amiloide en la membrana basal glomerular y tubular es bien conocida en los patos. En la mayoría de los casos es parte de una amiloidosis generalizada, que causa graves daños en los glomérulos en el síndrome nefrótico. A menudo aparece posteriormente a la inflamación crónica. A pesar de buen apetito, las aves pierden peso y parecen letárgicas (Morigachi *et al.* 1974). Los signos clínicos pueden incluir ascitis o edema de las extremidades, y el diagnóstico se confirma a postmortem o por biopsia renal (Lumeij, 1994).

Otra enfermedad, la nefrosis, se desarrolla tras la exposición a toxinas o es secundaria a infecciones que no necesariamente tiene que ver con el riñón (Siller, 1981). La nefrosis describe los cambios degenerativos del riñón sin presentarse inflamación. En la mayoría de los casos los túbulos proximales y distales se ven

afectados, rara vez los conductos colectores (Tudor, 1979; Siller, 1981). Atrofia o hipertrofia glomerular puede ocurrir.

Las nefropatías inducidas por toxinas (nefrotoxinas) comúnmente causan necrosis tubular renal. Los psitácidos son especialmente sensibles a los metales pesados (por ejemplo, plomo) y las micotoxinas (aflatoxina, ocratoxina) (Siller, 1981). Las micotoxinas pueden ingerirse con alimentos de baja calidad contaminada por *Aspergillus spp.* Algunas drogas, por ejemplo, gentamicina, también son conocidos por ser nefrotóxicos. Frutas y verduras contaminadas con plaguicidas puede causar necrosis tubular renal. La ingestión de agua salada puede causar nefropatía e insuficiencia cardiaca (Lumeij, 1994).

Las nefritis tienden a ser enfermedades secundarias a infecciones sistémicas, y se caracterizan por una inflamación histológica visible. Algunos patógenos, por ejemplo, Paramixovirus, tienen un tropismo específico de las células renales. Histológicamente, la nefritis se puede dividir en glomerulonefritis y nefritis intersticial, y ambos pueden presentarse de manera aguda o crónica. La nefritis aguda septicémica es frecuente en las aves, debido a la diseminación hematogena de agentes patógenos en el riñón. Infecciones ascendentes de la cloaca también las producen. La pielonefritis es más frecuente en los casos de infecciones bacterianas o parasitarias. Los signos clínicos están dominados por la infección sistémica coexistente. Polidipsia y poliuria se observan, con anuria durante la etapa terminal. nefritis crónica puede desarrollarse luego de una enfermedad aguda. En la mayoría de los casos el intersticio, túbulos y glomérulos están afectados. Depósitos de urato son comunes. Los síntomas clínicos son poco comunes, como el riñón compensa la pérdida de tejido funcional. En algunos casos el estrés lleva a los signos observados de letargo, pérdida de peso y anorexia. Polidipsia desarrolla muy tarde en el curso de la enfermedad (Gylstorff y Grimm, 1998).

## 2.5. SISTEMA URINARIO DE LOS POLLOS

### 2.5.1. Anatomía del sistema urinario de los pollos

El sistema renal de los pollos está conformado por un par de riñones, similares en conformación y tamaño, así como los ureteres que transportan a la orina hacia el urodeo de la cloaca. Los riñones están situados en ambos lados de la columna vertebral y están en contacto con la pelvis y el sinsacro dorsal (figura 2.3; Lierz, 2003). Representan del 2 al 2.6% del peso corporal de las aves dependiendo de la especie y son relativamente más largos que los riñones de los mamíferos. Tienen una longitud aproximada de siete cm y una anchura transversa de dos cm formando un rectángulo alargado (Getty, 1998). La pelvis renal y la vejiga están ausentes en las aves (Sturkie, 1986; Lierz, 2003).

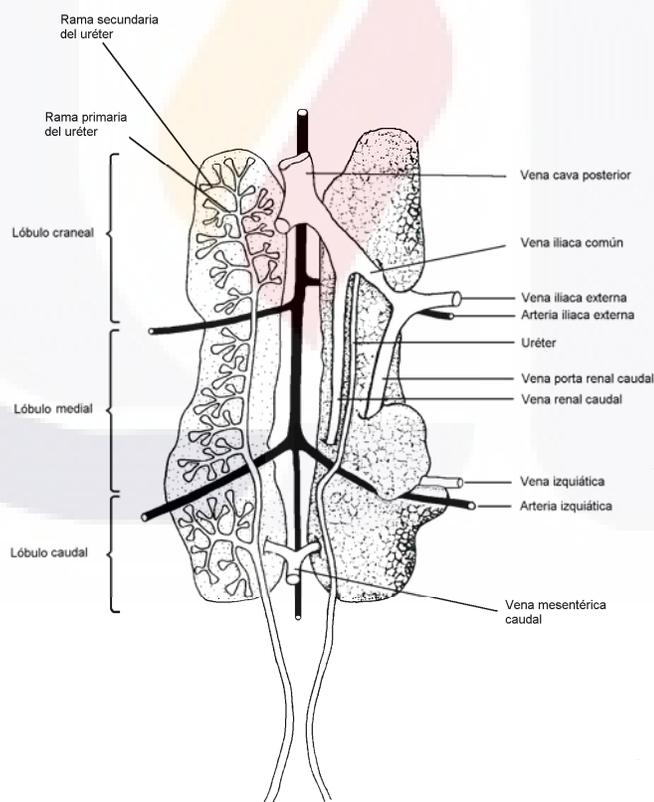
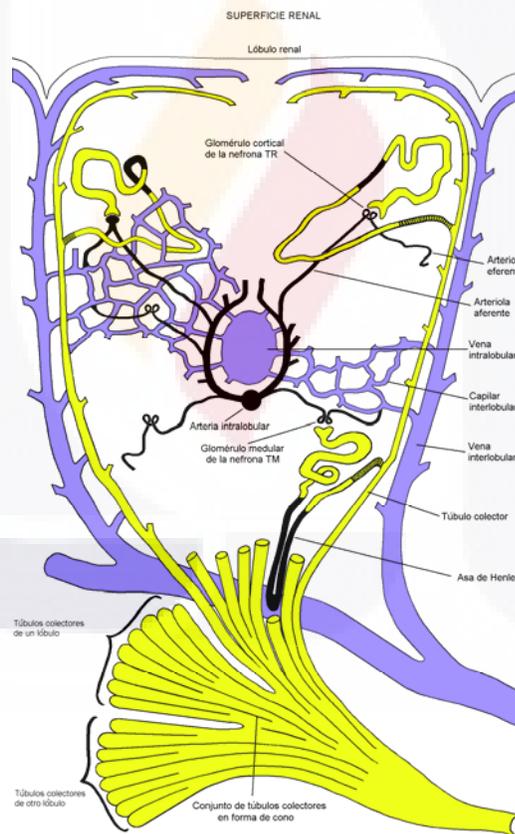


Figura No. 2.3. Vista ventral de los órganos urinarios del pollo. Tomado de Getty (1998).

**2.5.1.1. Lóbulos renales.** Cada riñón está dividido en tres secciones (lóbulos) de casi igual longitud, denominados como: lóbulo craneal, que es redondeado; lóbulo medial, el cual es más alargado; y el lóbulo caudal, que tiene una forma expandida e irregular (Getty, 1998). El lóbulo craneal de los riñones se extiende hacia adelante para alcanzar el pulmón mientras que el caudal alcanza casi el extremo anterior de las vértebras sacras fusionadas, denominadas colectivamente como sinsacro (Siller y Hindle, 1969). Cada lóbulo se divide en lóbulos de drenaje y cada lóbulo de drenaje tiene una corteza y médula, y se unen a través de sus conos medulares en una misma rama secundaria del uréter. Los lóbulos de drenaje son zonas de tejido renal en forma de pera las cuales están rodeadas por los túbulos colectores, los cuales drenan la orina (figura 2.4; Lierz, 2003).



*Figura 2.4. Diagrama de un lóbulo de drenaje donde se muestra la ubicación de las nefronas tipo reptil (TR) y tipo mamífero (TM), tubos colectores, conos medulares y vasos sanguíneos internos. Tomado de Getty (1998)*

**2.5.1.2. La nefrona.** Los riñones de las aves contienen dos áreas: una cortical y otra medular, pero la línea de demarcación entre ellas es indistinguible. El área cortical se sitúa en la superficie del riñón y contiene nefronas simples del tipo de los reptiles (TR). Estas nefronas son más frecuentes que las medulares (hasta un 90%); sus glomérulos son más pequeños y no poseen asa de Henle (Lierz, 2003), y sus túbulos distales forman ángulos rectos en su desembocadura a los tubos colectores (figura 2.5; Getty, 1998).

Las nefronas están dispuestas en forma radial en relación con la vena eferente central para formar unidades cilíndricas o lóbulos. En lo más profundo de la corteza (medula), se encuentran nefronas con asa de Henle del tipo de los mamíferos (TM) las cuales tienen una asa Henle larga, que surge de las arteriolas eferentes del glomérulo, además se encuentran los tubos colectores que drenan de ambos tipos de nefrona (Lierz, 2003), se disponen en forma paralela limitados por una vaina de tejido conectivo dentro de una unidad encintada denominada cono medular. Todos los lóbulos de drenaje en el mismo lóbulo drenan en la misma rama secundaria del uréter, que luego se une a una rama ureteral primaria. Las ramas del uréter están recubiertas por un epitelio secretor de moco y los uratos se excretan en forma de suspensión coloidal (Lierz, 2003). Sturkie (1986) menciona que el número de conos medulares por riñón es similar en una sola especie pero varía considerablemente entre las especies. El arreglo de los túbulos en el cono permite la operación de un sistema de contracorriente multiplicado.

**2.5.1.3. El glomérulo.** En las aves es más simple que el de los mamíferos y está formado por unas pocas asas capilares que rodean un núcleo no vascular de células. Los glomérulos en la región cortical del lóbulo son los más simples (TR), algunas veces constan de solamente dos asas capilares, mientras que los que están cerca de la médula (TM) son ligeramente más completos (figura 2.5). Estas diferencias regionales en la complejidad del glomérulo se deben, fundamentalmente, al tamaño relativamente pequeño de los corpúsculos renales de la nefrona de tipo cortical y al tamaño, relativamente grande, del corpúsculo renal de la nefrona de tipo medular.



*Figura No. 2.5. Micrografía electrónica de un glomérulo de pollo mostrando el surgimiento de la arteriola aferente de la arteria intralobular (X) y el arreglo de las asas capilares y la arteriola eferente (Siller, 1971, tomado de Sturkie, 1986).*

El aporte arterial de la médula procede de las arteriolas eferentes provenientes de las nefronas corticales. Las arteriolas eferentes dan origen a la vasa recta que desciende por los conos piramidales de la médula, para doblarse sobre sí mismas y ascender en capilares rectos. Esta disposición es análoga a las *vasa recta* de los mamíferos (Getty, 1998).

**2.5.1.4. Los ureteres.** Son órganos pares simétricos en su situación anatómica; pueden dividirse en una porción renal que pasa a lo largo del riñón y una pelviana que va desde el riñón a la cloaca.

La porción renal asienta en la profundidad de la división craneal, más cerca de la parte ventral que de la superficie dorsal. El resto de la parte renal del uréter ocupa un surco de la superficie ventral del riñón. Se trata de un tubo que recibe una serie de tributarias simples, variables en tamaño y número. Típicamente, existen alrededor de 17 vasos tributarios, o ramas primarias del uréter, que varían en cuanto a su longitud.

Los extremos periféricos de las ramas secundarias conducen a unas estructuras de túbulos colectores, de forma cónica. Normalmente existe de 5 a 6 estructuras que convergen en una rama primaria del uréter. El aporte arterial se realiza desde la red anastomótica de las ramas uretéricas que surgen de las arterias renales craneal, medial y caudal (figura 2.4).

La parte pelviana va desde el extremo caudal del riñón para abrirse en la región dorsal del urodeo, inmediatamente dorsal a la abertura genital. Esta parte pelviana se localiza en un pliegue del peritoneo con el conducto genital masculino o con el conducto genital izquierdo femenino (Getty, 1998).

**2.5.1.5. Irrigación.** Existen tres pares de arterias renales, la craneal o anterior, la medial y la caudal o posterior, que irrigan, como sus nombres lo indican, los lóbulos craneal, medial y caudal del riñón. La arteria renal craneal (gonadorenal) surge de la aorta; las arterias renal medial y la renal caudal surgen por un tronco común a partir de la arteria izquiática o arteria ilíaca externa (Siller y Hindle, 1969).

Las ramas de las arterias renales dan origen a las arterias intralobulares, cada una de las cuales va paralela con las venas intralobulares por el centro de un lóbulo renal, las cuales se ramifican para formar las arteriolas eferentes de los glomérulos (Getty, 1998).

Las arteriolas eferentes glomerulares se unen a las ramas de la vena interlobular (sangre portal renal) y forman el plexo peritubular. Los riñones tienen suministros de sangre arteriales y venosos aferentes. El riego arterial de la división craneal de los riñones proviene de una rama de la aorta. Las ramas de las arterias isquiáticas abastecen de sangre las divisiones medial y caudal. Las arteriolas forman los penachos capilares de los glomérulos, que son responsables de la ultrafiltración de la sangre (Lierz, 2003)

Estas últimas se vacían en la red capilar interlobular relacionada con los túbulos renales y quedan unidas cerca del borde del lóbulo. Esta red está integrada también por las venas interlobulares de sistema venoso portal. Un reducido

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

número de ramas cortas y rectas surgen directamente de las arterias interlobulares y se vacían en las redes mencionadas (figura 2.5). La red drena a la vena intralobular del sistema venoso eferente (Getty, 1998).

Un sistema renal portal con sangre venosa aferente, que no existe en los mamíferos, es importante para las aves. Las venas ilíacas externa e interna y las venas mesentéricas isquiáticas y caudales recogen la sangre venosa del sistema capilar de las extremidades, la cola, la pelvis, la parte caudal del intestino y la columna vertebral (figura 2.6). Estos vasos se anastomosan para formar la vena porta caudal. La vena porta craneal (una rama de la vena isquiática externa) y la vena porta caudal forman un anillo venoso ubicado en la porción ventral del riñón. Una válvula portal renal se encuentra dentro de la vena ilíaca común para regular el flujo de sangre venosa a través del riñón. Cuando la válvula está cerrada, la mayor parte de la sangre venosa del sistema capilar se dirige a través del riñón. Esto ocurre cuando el ave está en reposo. Cuando la válvula se abre la sangre venosa se dirige hacia la vena cava caudal, sin pasar por el riñón (Lierz, 2003).

Las porciones derecha e izquierda de la válvula portal renal pueden funcionar de manera independiente. Células musculares lisas vasculares tienen inervación simpática y parasimpática. La estimulación adrenérgica provoca la relajación de los músculos de la válvula, mientras que la colinérgica causa contracción. El músculo liso de la vena renal portal caudal se contrae bajo estimulación adrenérgica. Estas respuestas autonómicas gobiernan el flujo de sangre portal renal. En la estimulación simpática la válvula está abierta y la sangre no pasa por el riñón. La estimulación parasimpática aumenta la resistencia de la válvula y la sangre entra en el sistema porta renal.

La sangre venosa aferente entra en la red capilar peritubular y se mezcla con la sangre eferente arteriolar glomerular. Venas estriadas convergen para formar las venas renales proximales caudal y craneal a las válvulas renal portal en la vena ilíaca común. Los capilares peritubulares reabsorben grandes cantidades de soluto y agua de los túbulos renales (Lierz, 2003).

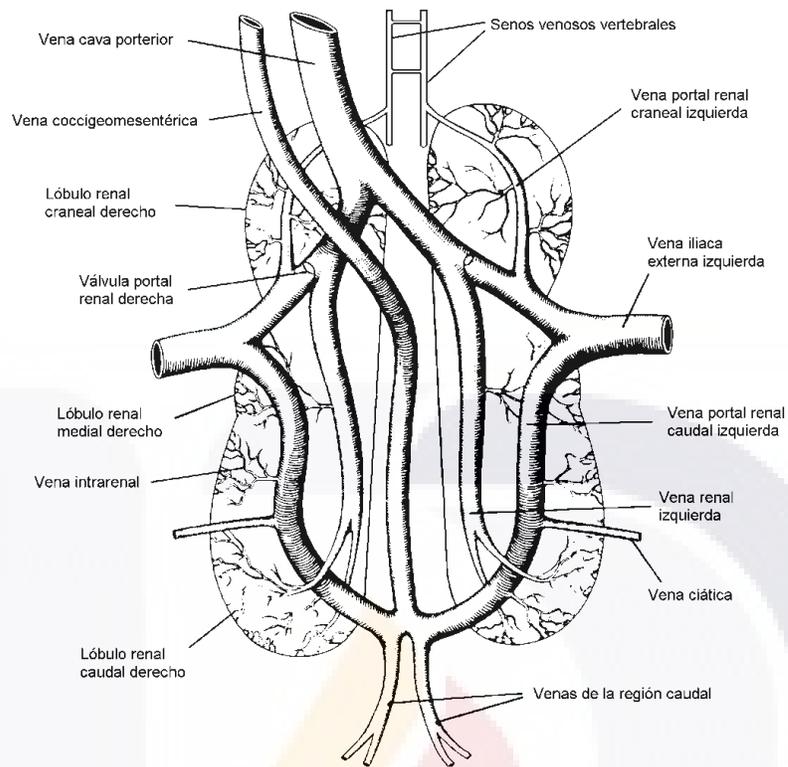


Figura No. 2.6. Irrigación venosa de los riñones de pollo (Sturkie, 1986)

## 2.5.2. Función renal en el pollo

Para realizar sus funciones, los riñones desarrollan tres procesos básicos: la filtración, la secreción y la reabsorción. En efecto, estos órganos filtran a las sustancias disueltas en el plasma sanguíneo y reabsorben el agua y los nutrientes necesarios para la vida, como la glucosa y los aminoácidos, eliminando a su vez los productos de desecho del metabolismo celular que son incorporados en la orina. Los procesos antes descritos se desarrollan de manera continua y simultánea (Sturkie, 1986).

**2.5.2.1. Filtración glomerular.** Es el flujo masivo de líquido de los capilares glomerulares a la cápsula de Bowman (Eaton y Pooler, 2006). En condiciones normales, el filtrado contiene todos los constituyentes del plasma, excepto las proteínas. En términos generales pueden difundir libremente cualquier sustancia que tenga un peso molecular menor o igual 5,000 daltones. Además, difunden

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

más fácilmente las moléculas sin carga eléctrica o carga positiva (Eckert, 1990). De esta manera, las moléculas de peso elevado, como las proteínas, normalmente no pasan a través de la pared capilar.

La presión hidrostática del capilar glomerular es uno de los principales factores que determinan la magnitud de la filtración, su valor es superior a las presiones hidrostática de la membrana capsular y la oncótica plasmática (Sturkie, 1986).

La presión arterial y el diferencial de la resistencia arteriolar del glomérulo, determinan el valor de la presión hidrostática del capilar, de tal manera que, variaciones extremas en la presión arterial modifican sustancialmente la filtración glomerular. Aunque la presión arterial puede afectar la filtración glomerular, no influye apreciablemente en los procesos de secreción o reabsorción tubular.

Al respecto, se ha descrito que la presión arterial de pollos no anestesiados presenta valores de 190/150 mm de Hg, sistólica y diastólica, respectivamente. Sin embargo, en pollos anestesiados con barbitúricos (barbital) se han reportado valores de 130/85, sistólica y diastólica, y una presión media de 108 mm de Hg (Sturkie, 1986).

Presión de filtración efectiva (Pfe). Ésta se obtiene restando la presión del líquido de la capsula de Bowman (Pc) y la presión oncótica de las proteínas (Po) a la presión hidrostática en el capilar glomerular (Phs), por lo tanto:

$$Pfe = Phs - (Pc + Po)$$

La Phs y la Pfe se pueden estimar determinando la presión requerida en los riñones o ureteres para detener el flujo de orina. En pollos, la presión para detener el flujo de orina en ureteres puede ser tan alta como 32 ó tan baja como 7.5-15 mm de Hg (Sturkie, 1986).

**2.5.2.2. Reabsorción y secreción tubular.** El volumen y la composición de la orina difiere mucho del filtrado glomerular, ya que los procesos de reabsorción y secreción realizados en el sistema tubular producen importantes modificaciones en su composición. El túbulo proximal, el asa de Henle y el segmento distal, constituyen el sistema tubular de la nefrona y es en estos sitios donde se lleva a cabo la concentración del fluido tubular y la secreción de elementos no filtrados en el glomérulo, tal como puede verse en la figura No. 2.7 (Bowman y Rand, 1985; Sturkie, 1986).

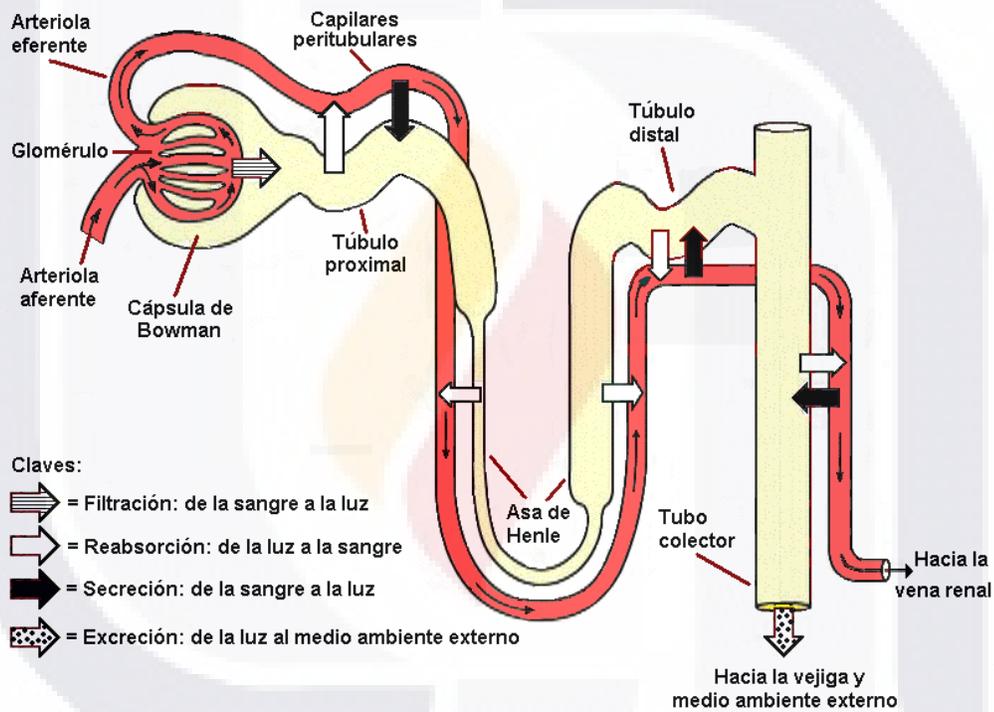


Figura No. 2.7. Filtración, secreción y reabsorción de sustancias en la nefrona (Martínez, 2003).

Durante la filtración glomerular, difunde del 15 al 25% del volumen plasmático y ciertas sustancias disueltas. Dantzler y Braun (1980) describen que el riñón de las aves tiene capacidad para concentrar la orina. Este proceso depende de un sistema multiplicador de contracorriente dado por la disposición de las asas de

Henle en la médula, las vasa recta y los tubos colectores que se encuentran en un arreglo paralelo dentro de los conos medulares.

Durante la secreción o la reabsorción de sustancias, los desplazamientos pasivos se producen cuando las membranas celulares son permeables a los elementos movilizados y en una dirección a favor de un gradiente de concentración o electroquímico. En cambio, cuando la sustancia es transportada en contra de un gradiente, se utiliza energía metabólica por las células tubulares, esto genera gradientes osmóticos o de concentración y se producen movimientos de agua y de solutos en ciertas direcciones. (Bowman y Rand, 1985). Algunas sustancias, que no se filtran, o se filtran parcialmente, son transportadas hacia los túbulos renales desde los capilares peritubulares, este mecanismo denominado secreción es especialmente importante para eliminar algunas sustancias, tales como: el ácido úrico en aves y reptiles y la creatinina en peces, pollos, simios y el hombre. La actividad secretoria es una función relativamente más importante en las aves que en los mamíferos (Sturkie, 1986).

**2.5.2.3. Regulación del equilibrio de agua.** Una de las funciones esenciales de los riñones es la de mantener el equilibrio de los solutos y del agua, lo que determina la osmolaridad del medio extracelular, de tal manera que esto influye indirectamente en la composición del medio intracelular.

La reabsorción de agua en la nefrona, que pasa de manera especial a través de la membrana de las células tubulares, está determinada por los gradientes de presiones osmótica e hidrostática (fuerzas de Starling). La gran mayoría del agua es reabsorbida pasivamente por ósmosis, gracias a los gradientes establecidos por la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los diferentes segmentos de los túbulos renales.

La pérdida de agua debe ser igual a su ganancia, lo cual implica una serie de mecanismos reguladores de los procesos involucrados para este equilibrio como son: la ingestión de agua durante la deshidratación, la pérdida urinaria, la transpiración enfocada al control de la temperatura y la pérdida de agua en heces

que es constante y pequeña. El control en el volumen urinario es el principal mecanismo por el cual se regula el agua del organismo (Sturkie, 1986).

Se ha descrito que los riñones de las aves permiten la excreción fraccionaria de agua en valores tan altos como 33% durante la hidratación y tan bajos como 0.8% durante la deshidratación (figura 2.8). Además, se ha señalado que la capacidad de los riñones de las aves para conservar o excretar el agua es mayor que en los mamíferos (Skadhåuge, 1981).

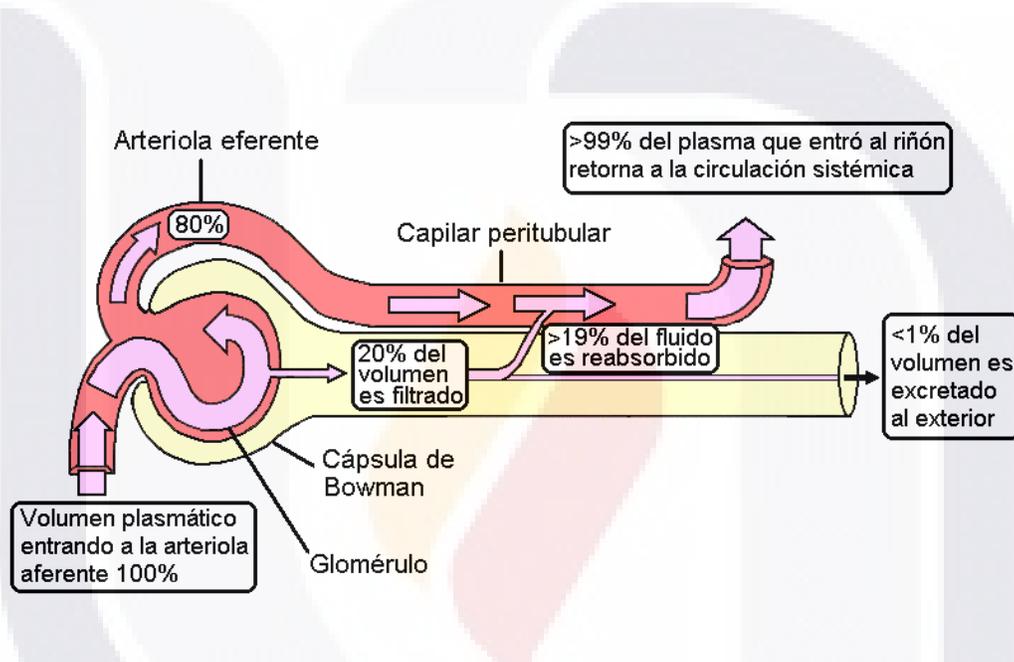


Figura No. 2.8. Manejo del agua por la nefrona (Martínez 2003)

**2.5.2.4. Manejo renal del sodio.** La concentración de los iones que determinan las propiedades del líquido extracelular es regulada principalmente por los riñones. Tal es el caso de los iones sodio, potasio, cloruro, calcio, magnesio, sulfato, fosfato y los iones hidrógeno.

Un ión de sodio ( $\text{Na}^+$ ) es un catión, es decir un átomo cargado positivamente que tiene la capacidad de generar un gradiente eléctrico. En los diferentes compartimentos corporales la suma eléctrica de los diferentes iones (cationes y

aniones) debe ser cero (electro neutralidad) sin importar la carga total en cada compartimento.

Aunque el sodio se filtra al pasar por glomérulo, un porcentaje muy alto se reabsorbe en las diferentes porciones de la nefrona. Entre el 60-70% del  $\text{Na}^+$  filtrado se reabsorbe en el túbulo proximal acompañado de un anión (carga negativa) para mantener la electroneutralidad (el 75% es  $\text{Cl}^-$  y el 25% es  $\text{HCO}_3^-$ ); también se reabsorben dos tercios del agua filtrada gracias a la fuerza osmótica generada por la absorción de sodio (Eaton y Pooler, 2006).

Para este fin existen cuatro mecanismos diferentes:

- Transporte activo primario  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$
- Cotransporte  $\text{Na}^+$ -soluta (glucosa, aminoácidos, lactato etc.)
- Intercambio  $\text{Na}^+$ -Hidrógeno (antiporte)
- Cotransporte de  $\text{Na}^+$  fosfatos.

En el asa de Henle se reabsorbe aproximadamente el 25% del  $\text{Na}^+$  filtrado y el 20% del agua y urea, de esta forma el líquido isotónico que sale del túbulo proximal se concentra y luego se diluye para ingresar a los túbulos contorneado distal y colector como una sustancia hipotónica (Eaton y Pooler, 2006).

Los túbulos contorneado distal y colector se encargan de la reabsorción del 5-10% del  $\text{Na}^+$  y el 15% de agua que fueron filtrados en el glomérulo. Esta estructura también participa en la reabsorción de urea y la secreción de  $\text{K}^+$  e  $\text{H}^+$ . Algunos de estos efectos se hallan modificados de acuerdo a la concentración de hormona antidiurética (ADH).

La ADH aprovecha el mecanismo de contracorriente y las diferencias de permeabilidad al agua y los solutos a nivel del túbulo colector, para generar una reabsorción de urea y agua en grado variable según su concentración sanguínea.

Los principales mecanismos de control en la excreción y reabsorción de sodio son:

- Los cambios en la Tasa de Filtración Glomerular (TFG).
- La concentración de aldosterona mediada por sistema renina-angiotensina.
- Factor natriurético auricular.

El sodio filtrado puede ser reabsorbido hacia el plasma o bien secretado y excretado con la orina. En las aves sin glándulas nasales, el sodio es manejado por el riñón, pero en las que las poseen, de un 60 al 88% de la sal es eliminada por estas glándulas (Sturkie, 1986).

**2.5.2.5. Manejo renal de potasio.** El potasio es un catión pequeño, que no está unido a proteínas y que filtra libremente a nivel glomerular. A pesar que una pequeña parte del potasio se pierde por sudor y excreción fecal, la orina es la mayor vía de eliminación del potasio.

El 60-80% del potasio filtrado es reabsorbido en el túbulo proximal. El 10-20% se reabsorbe en el asa de Henle (multiportador Na/K/2Cl), por lo que normalmente, llega al túbulo colector, sólo el 10% del potasio filtrado. También se conoce que existe secreción de potasio en el túbulo colector. En caso de una sobrecarga de potasio, la carga filtrada permanece constante, pero la secreción tubular aumenta (regulación del potasio). La secreción de potasio desde la célula hacia el lumen tubular es pasiva depende de la permeabilidad luminal al potasio y del gradiente electroquímica a través de la membrana luminal. La excreción de potasio depende de la secreción por el túbulo colector (células principales). En casos de hipovolemia se desencadena una reabsorción del potasio. Los factores que regulan la excreción renal de potasio incluyen a la dieta, el pH, concentración en la porción distal de la nefrona, concentración de sodio en la porción distal de la nefrona distal y la hormona aldosterona (Eaton y Pooler, 2006).

**2.5.2.6. Manejo renal de calcio.** El calcio se encuentra en el cuerpo en tres formas principales: casi un 50% en forma ionizada libre ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que es la que presenta actividad biológica en los órganos blanco; aproximadamente un 15% incorporado en complejos con aniones como el citrato y el fosfato, mientras que el restante 40% unido a proteínas, por lo que solo es filtrado aproximadamente un 60% en el glomérulo, ya que por su unión a estas proteínas no puede pasar a través de los capilares glomerulares.

La reincorporación al organismo de los iones de calcio es paralela a la de sodio en el túbulo proximal, ya que para la resorción pasiva paracelular del calcio en este sitio, se requiere de un incremento en la osmolaridad del líquido del túbulo proximal, lo cual se logra por la absorción de agua derivada de la resorción de sodio y otros solutos. El túbulo proximal resorbe aproximadamente un 60% de la carga filtrada, la rama ascendente gruesa del asa de Henle recupera un 29% y el túbulo distal un 8%, en donde se regula por la actividad de la hormona paratiroidea. El restante 3 % se elimina en la orina (Eaton y Pooler, 2006).

**2.5.2.7. Manejo renal de fosfatos.** La mayoría del fosfato es filtrable en el glomérulo pero se reabsorbe más del 85% del fosfato filtrado, fundamentalmente en el túbulo proximal vinculado al transporte Na/K y a un cotransporte Na/P. La PTH es el principal regulador de la eliminación final de fosfatos, inhibiendo la reabsorción tubular; la vitamina D tiene un efecto similar, pero menos marcado. Además, la fosfaturia depende de forma directa del contenido dietético en fosfatos. Glahn *et al.* (1991) reportan la AF provocan una disminución de los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> (25-hidroxi-colecalciferol y 1,25-dihidroxi-colecalciferol); estos compuestos biológicos están involucrados en el balance de calcio y fósforo debido que participan en la reabsorción de estos elementos en el túbulo proximal. Como resultado de este efecto de las AF, el riñón no puede recuperar el calcio filtrada por los glomérulos ni en la absorción de ambos elementos en el intestino.

**2.5.2.8. Excreción de productos metabólicos.** Como resultado de algunas reacciones químicas realizadas dentro de las células se generan productos terminales los cuales deben ser eliminados, ya que su acumulación en el organismo produciría efectos tóxico, así la mayor parte de las sustancias de desecho metabólico son eliminadas por los riñones tan rápidamente como se producen (Sturkie, 1986).

**2.5.2.9. Excreción de xenobióticos.** Los riñones tienen la capacidad para metabolizar y eliminar sustancias químicas extrañas al organismo (xenobióticos), como: fármacos, pesticidas, aditivos de alimentos y sus respectivos metabolitos. Estas sustancias pueden ser eliminadas por filtración glomerular y por secreción tubular.

Con relación a la filtración se debe señalar que inicialmente la concentración de la fracción libre de los xenobióticos en el filtrado glomerular es la misma que en el plasma. Una vez que el filtrado glomerular ingresa en los túbulos renales se inicia el proceso de reabsorción, mediante el cual el agua y algunas sustancias disueltas en ella difunden (o son transportadas activamente) de la luz tubular hacia los capilares peritubulares, en los diferentes segmentos de las nefronas. Así, a medida que el líquido tubular se va concentrando (gradiente de concentración) se reabsorben con mayor facilidad los xenobióticos liposolubles, pero no los hidrosolubles (Klaassen, 2008).

La secreción tubular renal es un mecanismo eficaz que permite eliminar sustancias endógenas de desecho y xenobióticos del organismo, mediante un proceso activo que se realiza en contra de un gradiente electroquímico en el túbulo proximal de la nefrona y a través del cual los xenobióticos son secretados desde los capilares peritubulares hasta la luz tubular.

El riñón es uno de los órganos más susceptibles al efecto tóxico de algunos xenobióticos, esto debido a que posee ciertas particularidades estructurales y funcionales, entre las más importantes se encuentra el gran aporte sanguíneo que recibe por unidad de tiempo, del 10-25% del gasto cardiaco, así como su notable

capacidad para concentrar sustancias tóxicas en sitios específicos (Raucy, 1995; Walker, 1993).

**2.5.2.10. Regulación de la presión arterial.** Los riñones están íntimamente involucrados en la regulación de la presión arterial a través de mecanismos como el equilibrio del sodio y el sistema renina-angiotensina-aldosterona. El equilibrio del sodio es un factor crítico como determinante en el volumen sanguíneo circulante. El sistema renina-angiotensina-aldosterona es un complejo de enzimas, proteínas y péptidos que participan de manera importante en la regulación de la presión arterial mediante cambios en las propiedades cardíacas y hemodinámicas. Así, se ha descrito que algunos factores que disminuyen la presión arterial, como los que ocasionan decremento del volumen sanguíneo circulante (consumo bajo de sodio, pérdida de sangre, insuficiencia cardíaca congestiva) o la disminución de la resistencia periférica total, activan la liberación de renina en los riñones (Sturkie, 1986; Williams, 1984).

**2.5.2.11. Otras funciones reguladoras.** El factor eritropoyético renal participa en el control de la producción de eritrocitos por la médula ósea. Aún no se conoce cuáles células son las que lo secretan pero si se conoce que la disminución de suministro de oxígeno al riñón es el estímulo para su secreción. Además, los riñones producen el 1,25-dihidroxi-cole-calciferol, que es la forma más activa de la vitamina "D", hidroxilando el carbono 1 del 25-hidroxi-colecalciferol por mediación de la enzima  $1\alpha$  hidroxilasa. Este metabolito activo, tiene gran importancia en el metabolismo del calcio. También, durante privaciones prolongadas de alimento, el riñón sintetiza glucosa a partir de aminoácidos y la libera a la sangre (gluconeogénesis; Williams, 1984).

### **2.5.3. Orina**

**2.5.3.1. Características físicas de la orina de los pollos.** La orina de las aves es usualmente de color crema y contiene un denso material mucoide con mucho ácido úrico que está usualmente en forma insoluble. Generalmente, la orina es hiperosmótica aunque menos que la de los mamíferos; el rango de la osmolaridad

varia desde 115 hasta 2000 mOs/L (tabla 2.4). En condiciones extremas de hidratación, la orina puede ser clara, acuosa e hipoosmótica. La gravedad específica normal fluctúa de 1.0018 a 1.0150 g/L, pero aumenta o disminuye dependiendo de las condiciones de hidratación y osmolaridad (Sturkie, 1986).

*Tabla 2.4. Osmolaridad de la orina de pollo bajo condiciones de deshidratación media y carga de sal*

Tratamiento	Proporción Orina/plasma	Osmolaridad (mOs/L)	Iones (meq/L)		
			Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>
Deshidratado	1.60	538	134.0	70.0	19.0
Carga de sal	1.06	362	161.0	141.0	25.0
Hidratado	0.37	115	38.0	27.0	5.6

*Adaptado de Skadhauge y Schmidt Nielsen (1967)*

**2.5.3.2. Fosfato, bicarbonato y equilibrio ácido-base.** La estabilidad del pH en el medio interno es indispensable, ya que las células deben contar con condiciones fisicoquímicas estables en los líquidos en que se encuentran inmersas para sobrevivir y realizar sus funciones en forma óptima. La regulación precisa de la acidez o de la alcalinidad del medio interno se logra mediante mecanismos amortiguadores químicos y fisiológicos. Los riñones poseen una gran capacidad para amortiguar cambios en el pH plasmático, esencialmente modificando las características de la orina (Sturkie, 1986).

Uno de los factores que modifica de forma importante el pH de la orina de las aves es la postura, así dependiendo del estado de producción el pH urinario varía desde 4.7 a 8.0. Durante esta etapa, la remoción del calcio de los depósitos corporales para ser incorporado a las membranas testáceas del huevo, genera un exceso de iones H<sup>+</sup>, que al ser amortiguados mediante su reacción con bicarbonato, disminuyen las concentraciones de éste último y se manifiesta una tendencia a disminuir el pH plasmático. Bajo este estado funcional, en el sistema tubular renal se incrementa: la secreción de H<sup>+</sup>, de amoniaco, la titulación de fosfatos y la reabsorción de bicarbonatos, lo que en última instancia produce, orina ácida y con mayor concentración de amonio y fosfatos (Prashad y Edwards, 1973).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A pesar de que los pollos excretan de 1 a 2 g/día de ácido úrico, este compuesto y sus sales están pobremente disociados y actúan como amortiguadores eficientes; sin embargo, la proporción de ácido úrico que puede actuar como un ácido o una base no es conocido (Sykes, 1971).

**2.5.3.3. Constituyentes nitrogenados.** La principal diferencia en los constituyentes químicos de la orina de las aves, comparada con la de los mamíferos, es el predominio del ácido úrico sobre la urea (Sturkie, 1986).

Los valores de ácido úrico y de urea se pueden evaluar, pero las variaciones fisiológicas normales tendrían que ser consideradas. En aves de rapiña, se recomienda para la evaluación de la función renal un período de ayuno de 24 horas antes de la toma de muestras de sangre. Además, el aumento patológico del ácido úrico sólo se puede detectar si se pierde el 70% o más de la función renal, haciendo este parámetro inútil para la detección precoz. La concentración de urea puede ser utilizada para detectar la deshidratación, pero no para confirmar la disfunción renal (Lierz, 2003).

La proporción de urea y ácido úrico se puede utilizar para diferenciar las causas prerrenal y renal de azotemia. Azotemia prerrenal con niveles elevados de urea produce una relación alta urea:ácido úrico. La relación se calcula como la concentración plasmática de urea [mmol/L] 1000: la concentración plasmática de ácido úrico [mmol/L]. Estas proporciones normales deben establecerse para cada especie. La insuficiencia renal es probable cuando la concentración de ácido úrico está por encima del rango de referencia de especies en un individuo en ayunas. El daño severo del tejido podría dar lugar a una concentración de ácido úrico y produce la liberación de los ácidos nucleicos.

En las aves, la creatina es excretada en la orina antes de que se transforme en creatinina, por lo que los niveles de creatinina plasmática están bajos y tiene valor diagnóstico más limitado que en los mamíferos. La creatinina es excretada por filtración glomerular y se reabsorbe en los túbulos. Ambos mecanismos mantienen la concentración plasmática constante, y no se observa elevación postprandial. En

los casos de daño muscular grave, se liberan grandes cantidades de creatinina lo cual resulta en un aumento en la concentración plasmática de esta molécula, pero la excreción parece permanecer constante. La reducción de la filtración glomerular también puede conducir a un aumento de la concentración de creatinina. En teoría, si la tasa de filtración glomerular se conserva, pero los túbulos están dañados, la concentración plasmática de creatinina disminuye (Lierz, 2003).

**2.5.3.4. Eliminación de la orina.** La cantidad de orina eliminada en el pollo ha sido estudiada (Skadhauge y Schmidt-Nielsen, 1967; Karasawa y Sakae, 1981) y se reportan volúmenes de 1.08 y 17.9 mL/kg/h en pollos deshidratados e hidratados, respectivamente (tabla 2.5) y los promedios diarios alcanzan valores de 61.0 a 123 mL y 132 a 155 mL (Dixon, 1958).

Debido a que la orina y las heces se vacían a la cloaca, para la obtención de orina libre de materia fecal, es necesario cateterizar los ureteres o separar las desembocaduras de los ureteres y el recto por cirugía. También se puede obtener directamente de la cloaca taponando previamente la abertura anal. Se ha publicado que tanto el manejo de los ureteres, así como su cateterización, influyen en el volumen que se obtiene de orina al menos durante los primeros 30 min después de la cateterización, así como incrementos en el consumo de agua y en la diuresis después de la cirugía, cateterización y manipulación de los ureteres. (Sturkie, 1986).

*Tabla 2.5. Flujos de orina de pollo bajo condiciones específicas*

Condiciones experimentales	Flujos de orina *
Deshidratado	1.08 (mL/kg/h)
Hidratado	17.9 (mL/kg/h)
Carga de sal	10.9 (mL/kg/h)
Control	86.8 (mg/h/ave)
Diuresis	148.7 (mg/h/ave)

*Adaptado de Skadhauge y Schmidt, 1967a; Karasawa y Sakae, 1981*

*\* Las muestras de orina no fueron tomadas por cateterización de uréteres*

## 2.5.4. Parámetros de función renal en pollos

**2.5.4.1. Tasa de filtración glomerular.** El volumen de plasma que es filtrado por todas las nefronas funcionales de los riñones por unidad de tiempo, se define como tasa de filtración glomerular (TFG). El valor de este parámetro es más variable en las aves que en los mamíferos, entre los factores que influyen se encuentran: la técnica utilizada, el manejo, el muestreo, el estado de deshidratación y la carga de sales (tabla 2.6). La mayoría de los estudios indican que la deshidratación disminuye la TFG (Sturkie, 1976).

*Tabla 2.6. Valores promedio de depuración de inulina o tasa de filtración glomerular (TFG) en pollos*

Condición	TFG (mL/kg/min)	Referencia
Control	2.1	Martínez <i>et al.</i> , 2006
Control	1.23	Dantzler, 1966
Carga de sal	0.35	Dantzler, 1966
Carga de agua	3.2	Dantzler, 1966
Deshidratado	1.73	Skadhåuge y Schmidt-Nielsen, (1967)
Hidratado	2.1	Skadhåuge y Schmidt-Nielsen (1967)
Carga de sal (media)	2.1	Skadhåuge y Schmidt-Nielsen (1967)
Ayunas, hidratación media	1.81	Berger <i>et al.</i> (1960)
Arginina-Vasopresina T, Antidiuresis	2.7	Ames <i>et al.</i> (1971)

**2.5.4.2. Flujo sanguíneo renal (FSR).** Los riñones en el humano reciben un flujo sanguíneo muy elevado: más de 1 L/min o cerca del 20% del gasto cardiaco. Boelkins y Wolfenson (citados por Sturkie, 1986) señalan que el flujo plasmático renal estimado en pollos es aproximadamente el 10% del total del gasto cardíaco. El flujo sanguíneo renal participa en la formación del filtrado glomerular y en la secreción tubular de las sustancias endógenas y los xenobióticos (Freeman, 1983).

De la misma manera que la TFG, el FSR varía considerablemente, dependiendo del método usado para su determinación, además de otros factores como la

variación causada por la presencia de una circulación portal renal. Así, en pollos Sussex con un peso corporal de 2.3 a 2.9 kg, se ha encontrado que los valores medios de las depuraciones de los ácidos úrico y p-aminohipúrico (PAH) son de 68.5 y de 67.6 mL/min, respectivamente, lo que determina un flujo plasmático renal de 23-30 mL/min/kg (Sykes, 1960).

### 2.5.5. Depuración renal

El aclaramiento o depuración renal es definido como el volumen de sangre que es limpiado completamente de una determinada sustancia, por todas las nefronas funcionales de los riñones y es eliminada por la orina, por unidad de tiempo (Eaton y Pooler, 2006). La siguiente fórmula básica es utilizada para estimar la depuración:

$$D_x = \frac{U_x V}{P_x} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

$D_x$  = Depuración de la sustancia x

$U_x$  = Concentración de la sustancia x en la orina

$V$  = Volumen de orina por tiempo

$P_x$  = Concentración de la sustancia x en el plasma

Así, puede calcularse la depuración de cualquier sustancia que se encuentre en el plasma, siempre y cuando se excrete; aunque puede filtrarse total o parcialmente, reabsorberse ó secretarse.

La depuración de algunas sustancias exógenas, que en la nefrona tienen una dinámica característica; estas sustancias son utilizadas para evaluar ciertos parámetros del funcionamiento renal. De esta manera, para estimar la TFG y el FPR son empleadas las depuraciones de inulina y PAH, respectivamente.

**2.5.5.1. Depuración de inulina como indicador de la TFG.** La inulina es un polímero que contiene 32 moléculas de fructuosa, con un peso molecular de 5,200; es filtrada libremente a nivel glomerular, no se reabsorbe, no se secreta, de tal manera que toda la que se filtra se excreta (figura 2.9); además es fisiológicamente inerte para las células de los mamíferos, anfibios, reptiles y aves (Sturkie, 1986).

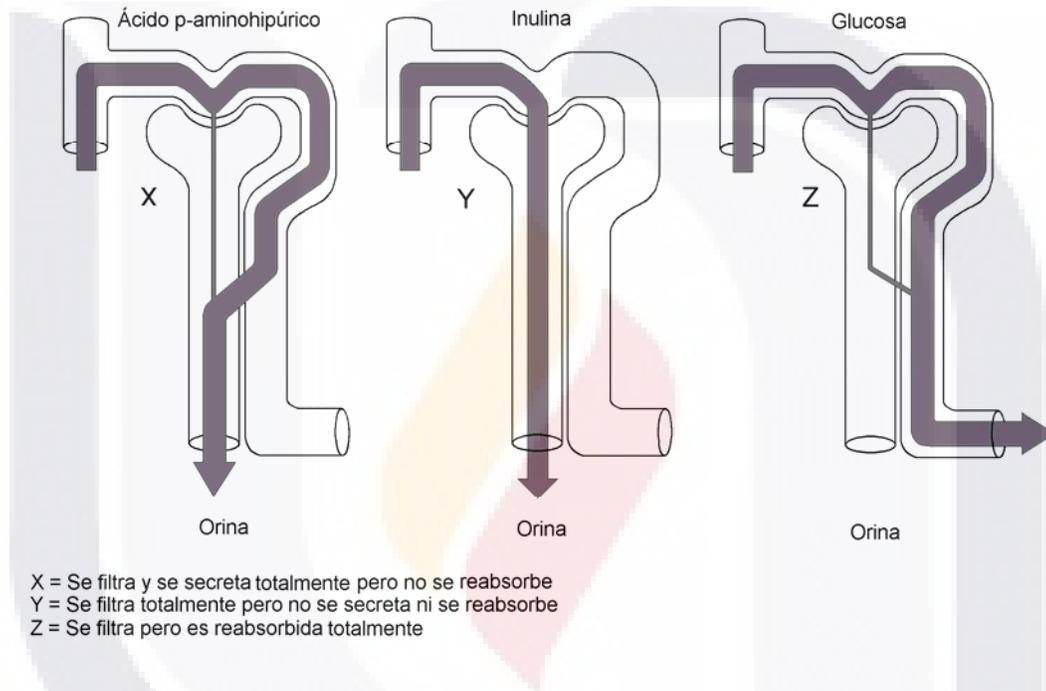


Figura No. 2.9. Manejo de ácido p-aminohipúrico, inulina y glucosa por el riñón. Adaptado de Vander, 1993.

Así, para aquellas sustancias que se filtran libremente, no se reabsorben ni se secretan, por lo que todo lo que se filtra se excreta, entonces se pueden realizar los cálculos (Vander, 1993).

$$\frac{\text{Masa filtrada}}{\text{Tiempo}} = \frac{\text{Masa excretada}}{\text{Tiempo}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde

*Masa = (Concentración de la sustancia) (Volumen del solvente)*

Por lo tanto

$$\text{Para la inulina filtrada} = \frac{([In]_{\text{plasma}})(\text{Volumen de plasma})}{\text{Tiempo}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{Para la inulina excretada} = \frac{([In]_{\text{orina}})(\text{Volumen de orina})}{\text{Tiempo}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Para cumplir con la ecuación 2

$$\frac{([In]_{\text{plasma}})(\text{Volumen de plasma})}{\text{Tiempo}} = \frac{([In]_{\text{orina}})(\text{Volumen de orina})}{\text{Tiempo}}$$

$$\text{Por definición TFG} = \frac{\text{Volumen de plasma}}{\text{Tiempo}}$$

por lo tanto

$$\text{TFG} = DIn = \frac{([In]_{\text{orina}})(\text{Volumen de orina})}{[In]_{\text{plasma}}} = \frac{UIn V}{PIn}$$

Como  $UIn V/PIn$  es constante e independiente de la concentración plasmática, entonces, la depuración de inulina ( $DIn$ ) nos proporciona una medida para estimar la filtración glomerular (Sturkie, 1986).

Es importante enfatizar que el uso sustancias exógenas para medir depuraciones renales, necesariamente se requiere, que la sustancia de prueba se administre a una velocidad constante, así como la cuantificación de ésta en muestras de orina y sangre a intervalos definidos (Vander, 1993).

La TGF es un parámetro de gran importancia en la fisiología renal, ya que no únicamente estima la magnitud de la filtración glomerular, sino que también permite deducir la dinámica de otras sustancias en el sistema tubular renal (Vander, 1993). Así, para sustancias que se filtran libremente a nivel del capilar glomerular:

*Masa excretada = Masa filtrada + Masa secretada – Masa reabsorbida*

Por lo que:

$$\frac{\text{Masa filtrada}}{(DIn)(Px)} - \frac{\text{Masa excretada}}{(UxV)} = \text{Masa reabsorbida} - \text{Masa secretada}$$

de tal manera que:

$$\frac{\text{Masa excretada}}{\text{Masa filtrada}} = \frac{UxV}{(TFG)(Px)} = \text{Excreción Fraccional (EF)}$$

Si EF es mayor de uno, entonces se concluye que existe una secreción neta. Por el contrario, si EF es menor de uno, entonces existe una reabsorción neta de la sustancia a prueba.

Si se utiliza inulina para medir TFG, y además se considera una misma unidad de tiempo y volumen de orina, la fórmula para la excreción fraccional es la relación de *Dx* y *DIn*.

$$\frac{UxV / Px}{UInV / PIn} = \text{Excreción Fraccional de } x.$$

**2.5.5.2. Depuración del ácido p-aminohipúrico (PAH) como indicador del FPR.** El PAH se caracteriza porque se filtra parcialmente a nivel glomerular, pero, en ciertos rangos de concentración plasmática, todo el PAH es secretado a nivel tubular. De acuerdo con lo anterior, un cierto volumen de plasma que llega a los riñones por unidad de tiempo, es limpiado o depurado de PAH. De esta forma, la depuración de PAH ( $D_{PAH}$ ) es utilizada para estimar el FPR. En las aves, el PAH,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

el diodrast y el ácido úrico son eficientemente depurados del plasma y han sido usados para estimar el flujo plasmático renal (figura 2.10).

Dantzler (1966) señala que el transporte máximo de PAH se alcanza cuando la concentración sanguínea de este marcador está entre los 10-20 mg/100 mL y que la dosis de mantenimiento es de 1.08-1.93 mg/kg/min. Además menciona que si se sobrepasan estos límites se puede subestimar el FPR, debido a que la cantidad de PAH secretada se vuelve constante.

La relación porcentual entre las depuración de inulina y PAH ( $D_{In}/D_{PAH}$ ) x 100, se define como fracción de filtración (FF) y representa el porcentaje del plasma que es filtrado en los riñones. La FF en los pollos es del 15%, este parámetro es inferior al que existe en los mamíferos (20-25%), esto probablemente debido a que el aporte arterial para el riñón del ave es aumentado con el influjo de sangre del sistema venoso portal renal (Holmes *et al.*, 1968).

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. HIPÓTESIS**

La intoxicación crónica con aflatoxinas en las gallinas de postura afecta la estructura y la fisiología renal, alterando la hemodinámica y el manejo renal de electrolitos.

#### **3.2. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el daño en las funciones y estructura de los riñones de gallinas de postura debido a la intoxicación alimentaria crónica con aflatoxinas

#### **3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.3.1. Desarrollar y estandarizar la metodología para evaluar la tasa de filtración glomerular, el flujo plasmático renal y el manejo renal de electrolitos en gallinas de postura.

3.3.2. Evaluar la hemodinámica renal de gallinas de postura intoxicadas con aflatoxinas, particularmente la tasa de filtración glomerular y el flujo plasmático renal.

3.3.3. Valorar el manejo renal de sodio, calcio, potasio y fosfatos en gallinas intoxicadas con aflatoxinas.

3.3.4. Valorar los cambios en la concentración de GSH y en la actividad de las enzimas GST y GGT en los riñones de gallinas intoxicadas con aflatoxinas.

3.3.5. Valorar las alteraciones de la función renal mediante la identificación de cambios en la estructura macroscópica y microscópica de los riñones así como su peso relativo en comparación con el peso corporal de las gallinas de postura

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. LUGAR DE ESTUDIO**

Este estudio se realizó en las instalaciones de la Posta Zootécnica del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, la cual está situada en el municipio de Jesús María, Aguascalientes. Sus características geográficas son 21° 57' 40" latitud Norte y 102° 20' 36" longitud Oeste, elevación de 1880 msnm, temperatura media anual de 17 °C con una precipitación anual de 531 mm principalmente en verano y con un clima predominantemente estepario, los vientos dominantes son alisios en dirección suroeste-noroeste durante el verano y noroeste-sureste en parte del otoño.

### **4.2. MATERIAL BIOLÓGICO**

En una incubadora local fueron adquiridas 80 gallinas de postura Leghorn blancas de un día de edad y se seleccionaron de acuerdo a la semejanza de peso corporal (media  $\pm$  5.0 %) y ausencia de defectos morfológicos. Las aves fueron criadas por procedimientos zootécnicos estándar (FASS, 1999; Hy-Line International, 2007) se alojaron en jaulas dentro de la Unidad de Gallinas de Postura de la Posta Zootécnica.

### **4.3. ELABORACIÓN DEL ALIMENTO CONTAMINADO**

El alimento que se utilizó para la intoxicación crónica con aflatoxinas de las gallinas de postura fue elaborado en el Laboratorio de Fisiología Animal e Investigación del Centro de Ciencias Agropecuarias. La preparación de este alimento se realizó mediante la utilización de una dieta base libre de aflatoxinas elaborada en la Fábrica de Alimentos de la Posta Zootécnica y con características

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nutricionales que alcanzaron o rebasaron los requerimientos de nutrientes señalados por la *National Research Council* (NRC, 1994), no se le añadieron coccidiostatos, antibióticos ni promotores del crecimiento. La dieta base y el maíz contaminado fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar su contenido de aflatoxinas de acuerdo al método señalado por la AOAC (Scott, 1995), y posteriormente a la dieta base se le adicionó el maíz contaminado con aflatoxinas para obtener concentraciones de 0.00, 0.5, 1.0 y 1.5 mg de aflatoxinas por kg de alimento; el agua y los alimentos control y contaminado fueron suministrados *ad libitum* desde la semana 13 hasta la semana 80 de edad de las gallinas.

#### 4.4. PREPARACIÓN DEL MAÍZ CONTAMINADO CON AFLATOXINAS

Para la producción de aflatoxinas, en el Laboratorio de Fisiología Animal e Investigación del Centro de Ciencias Agropecuarias se utilizaron dos cepas toxicogénicas de *Aspergillus flavus* (Cuautitlán y Tamaulipas)<sup>1</sup> con las cuales se realizó la contaminación del maíz utilizando la metodología señalada por Shotwell *et al.* (1966) modificada por Moreno-Martínez *et al.* (2000), que se fundamenta en el cultivo del hongo en el medio de cultivo agar-papa y posteriormente ser inoculado en una dosis de  $5.0^6$  esporas en 100 g de maíz que contenía un 15% de humedad y al que previamente se le había adicionado un fijador de esporas (aceite de parafina al 1.0 %) para después ser incubado en un frasco ligeramente cerrado a una temperatura de 29 °C durante 18 días, todo bajo condiciones de esterilidad. Se estimó por HPLC la concentración porcentual promedio de las aflatoxinas en el maíz contaminado obteniéndose  $88.1 \pm 13.2$ ,  $9.9 \pm 1.4$ ,  $1.5 \pm 0.08$  y  $0.5 \pm 0.02$  para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> respectivamente. Este maíz fue adicionado al alimento base en la cantidad necesaria para obtener las concentraciones deseadas para cada lote de alimento que se proporcionó.

---

<sup>1</sup> Proporcionadas por el Dr. Ernesto Moreno Martínez. Unidad de Investigación en Granos y Semillas, FES- Cuautitlán, UNAM.

#### 4.5. VARIABLES BAJO ESTUDIO

Se estimaron los siguientes parámetros de función renal:

- Peso corporal de las gallinas. Se registro mediante el uso de una balanza granataria.
- Peso relativo de los riñones de las gallinas. Se estimó mediante la fórmula:  $(\text{Peso de los riñones}/\text{peso corporal del ave}) * 100$ .
- Tasa de filtración glomerular. Se cuantificó mediante la depuración de inulina ajustándose los datos absolutos por el factor de kg de peso corporal de la gallina respectiva.
- Flujo plasmático renal. Se cuantificó mediante la depuración de ac. p-aminohipúrico ajustándose los datos absolutos por el factor de kg de peso corporal de la gallina. Para la estimación las variables anteriores se siguió lo descrito en el método reportado por Martínez *et al.* (2006).
- Excreciones fraccionales de sodio, potasio, calcio. Se cuantificaron por el método flamométrico con dilución de plasma y orina 1:1000. Las excreciones fraccionales se estimaron con la fórmula:  $\text{depuración del analito estudiado}/\text{depuración de inulina}$ . Los datos absolutos fueron ajustados con el factor de kg de peso corporal de la gallina respectiva.
- Excreción fraccional de fosfatos. Se estimó por el método colorimétrico de Sumner (1944) y se ajustaron los datos absolutos por el factor de kg de peso corporal de la gallina.
- Para la cuantificación de esta variable se utilizaron los métodos descritos por Cohn y Lyle (1966) y Hissin e Hilf (1976)
- Cuantificación de la actividad específica de las enzimas: Transferasa de glutatión (Habig *et al.*, 1974) y transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo (IFCC, 1983; Beleta and Gella; 1990; Kit comercial Biosystem) y se ajustaron los valores con la concentración de proteína en el tejido renal.
- Concentración de proteínas totales. Para la cuantificación de este parámetro se utilizó el método de Gornall *et al.* (1949).

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Estudio histopatológico. Este estudio se desarrolló mediante la técnica descrita por Prophet (1994).

#### **4.6. MATERIALES PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Para la cateterización de los ureteres, la arteria y la vena tibiales, se utilizaron tubos de polietileno Intramedic, de formulación médica para pruebas con animales, de los siguientes calibres y diámetros internos y externos:

- Catéteres para ureteres. PE160, 0.045 – 0.062.
- Catéteres para vena. PE90, 0.034 – 0.050.
- Catéteres para arteria. PE50, 0.023 – 0.038
- Jeringas desechables de 3, 5, 10, 20 y 60 mL.
- Tubo traqueal sin tapa. Tubo de polietileno de 2.0 mm de diámetro interno y 2.9 mm de diámetro externo.
- Tijeras rectas y curvas para microcirugía.
- Pentobarbital sódico a una concentración de 63 mg / mL.
- Hilo de algodón de calibre 2.

#### **4.7. REACTIVOS**

Para el procesamiento de las muestras de sangre y orina y la consecuente obtención de los valores de los parámetros bajo estudio, se adquirieron de Merck y Sigma Chemical Co. los siguientes reactivos: inulina, ácido p-aminohipúrico, ácido sulfúrico químicamente puro, antrona, ácido perclórico, fructuosa, ácido clorhídrico 1.2 N, nitrito de sodio, sulfamato de amonio y dicloruro de N-1-naftiletildiamino.

#### **4.8. EQUIPO UTILIZADO**

- Equipo Biopac Systems (modelo MP150CE) con Modulo Universal DA-100C y transductor de presión arterial. Este equipo fue utilizado para llevar

a cabo el registro de la presión arterial de las aves sometidas al análisis de función renal.

- Bomba de infusión (Kd Scientific modelo 780200). Fue utilizada para la infusión controlada de marcadores de función renal (inulina y ácido p-aminohipúrico).
- Balanza granataria (O'Haus de 2,610 g de capacidad). Balanza analítica (Chio Jupiter modelo SD-170, 170 g de capacidad). Báscula ACCULAB (modelo VI-200 con capacidad de 200 g).
- Espectrofotómetro UV-Visible (Varian modelo DMS-80). Se utilizó para cuantificar la inulina y ácido p-aminohipúrico. Flamómetro (Corning 410). Utilizado para cuantificar sodio, potasio y calcio en muestras de sangre y orina.
- Histoquinet (Leica TP 1020, Alemania) Utilizado para la preparación de las muestras de tejido renal Centro de Embebido (Leica EG1150H). Utilizado para la inclusión en bloques de las muestras de tejido renal
- Enfriador (Leica EG 1150C). Utilizado para la inclusión en bloques de las muestras de tejido renal Microtomo de rotación (Leica RM 2125). Utilizado para la obtención de cortes de muestras de tejido renal.
- Teñidor lineal semiautomático (Leica ST 4040). Utilizado en el teñido con hematoxilina y eosina de las laminillas obtenidas de muestras de tejido renal.
- Ultra Low Temperature Freezer (Thermo Scientific). Conservación de plasma y homogeneizados de tejido renal.
- Espectrofluorómetro (Perkin Elmer LS50B). Utilizado para cuantificar la concentración de GSH en tejido renal.
- Homogenizador Porter (Glas-Col model 099C K54). Utilizado para la obtención de homogeneizados de tejido renal.

## 4.9. METODOLOGÍA PARA LA PRUEBA DE FUNCIÓN RENAL

### 4.9.1. Procedimiento quirúrgico para el muestreo

Para la obtención de muestras sanguíneas y de orina se efectuó una cirugía en la gallina según el método descrito por Martínez *et al.* (2005) y Sturkie (1986) el cual se describe a continuación.

- Se anestesió el ave con pentobarbital sódico (25 mg/kg de P.C.).
- Se colocó la gallina en posición decúbito dorsal sobre un soporte que permitía su fijación y se efectuó una incisión en la cara interna del muslo derecho a nivel de la articulación del tarso, entre la piel y el tejido celular subcutáneo.
- La vena tibial se disecó para ser cateterizada posteriormente y así tener la vía de administración de la solución de infusión.
- Se efectuó una incisión en la parte anterior del muslo izquierdo a nivel del tercio medio. Los tendones y los músculos fueron separados para descubrir el paquete que contiene a la arteria tibial lateral y se procedió a disecar esta arteria.
- Se realizaron dos coaptaciones, una en la parte más inferior de la arteria y otra en la parte más superior, anudando con firmeza solamente la inferior.
- Se efectuó un pequeño corte de aproximadamente una tercera parte del diámetro del vaso sanguíneo entre las dos coaptaciones.
- Se introdujo un catéter de dos vías en dirección craneal, una vía para la toma del registro de presión arterial y la otra para la toma de muestras de sangre y se procedió a anudar firmemente la ligadura superior de tal manera que quedara sujeto el catéter.
- Con el fin de evitar muertes por broncoaspiración, se realizó una traqueostomía y se introdujo una sonda traqueal.

- Se realizó un corte en forma de “U” ventral a la cloaca, afectando piel, tejido celular subcutáneo, músculo y peritoneo.
- Con la finalidad de evitar contaminaciones por contenido intestinal, se efectuaron dos coaptaciones en la parte final del recto y se realizó un corte entre ellas para separarlo de la cloaca y así excluir el tubo digestivo.
- Se realizó tracción hacia fuera de la ligadura posterior colocada en el recto, para exteriorizar la cloaca y se localizaron los ureteres.
- Se disecaron los ureteres y se cateterizaron de manera similar a la vena y la arteria tibiales, descritas anteriormente.

#### **4.9.2. Hidratación y obtención de muestras de sangre y orina**

Una vez terminado el trabajo quirúrgico, se perfundió solución salina fisiológica, mediante bomba de infusión continua, a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min/kg P.C. hasta que disminuyeron la viscosidad y turbidez de la orina, lo cual se alcanzó alrededor de 30 min de infusión continua. Posteriormente, se disminuyó la velocidad del flujo a 0.7 mL/min/kg P.C. y se dejó estabilizar por 30 minutos hasta alcanzar un volumen constante de excreción de orina.

Se administró una solución concentrada de inulina (30 mg/kg P.C.) y PAH (2 mg/kg P.C.) como carga inicial para lograr una concentración estable en plasma. Posteriormente a la administración de la carga inicial, se perfundió una solución diluida de Inulina 4 mL (90 mg/mL), ácido para-aminohipúrico 4 mL (10 mg/mL) y 12 mL de solución salina fisiológica a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min/kg P.C. durante 30 minutos.

Al terminar este periodo, se obtuvieron dos muestras de orina (20 minutos c/u). A la mitad de cada período de recolección de la orina, fueron obtenidas las muestras de sangre. La toma de muestras pareadas se realizó con el fin de tener mejor representatividad de la función renal en los muestreos.

Después de la obtención de muestras de sangre y orina se procedió a proporcionar eutanasia al ave mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (figura 6.3).

#### 4.9.3. Registro de la presión arterial

Para asegurar la validez de los datos obtenidos en las pruebas de función renal, durante todo el periodo de toma de muestras (hidratación y perfusión de inulina y PAH) se elaboró un registro de presión arterial de cada gallina estudiada durante la prueba de función renal en las semanas seleccionadas del período de intoxicación. Se midió esta variable de control por medio de un transductor de presión arterial invasivo el cual fue conectado a un catéter insertado en la arterial tibial medial de las gallinas. Este transductor fue integrado a un sistema de registro fisiológico (BIOPAC-SYSTEMS) para registrar la presión arterial de las gallinas en experimentación (figura 4.1). Se corroboró su funcionamiento mediante registros de calibración con un manómetro.

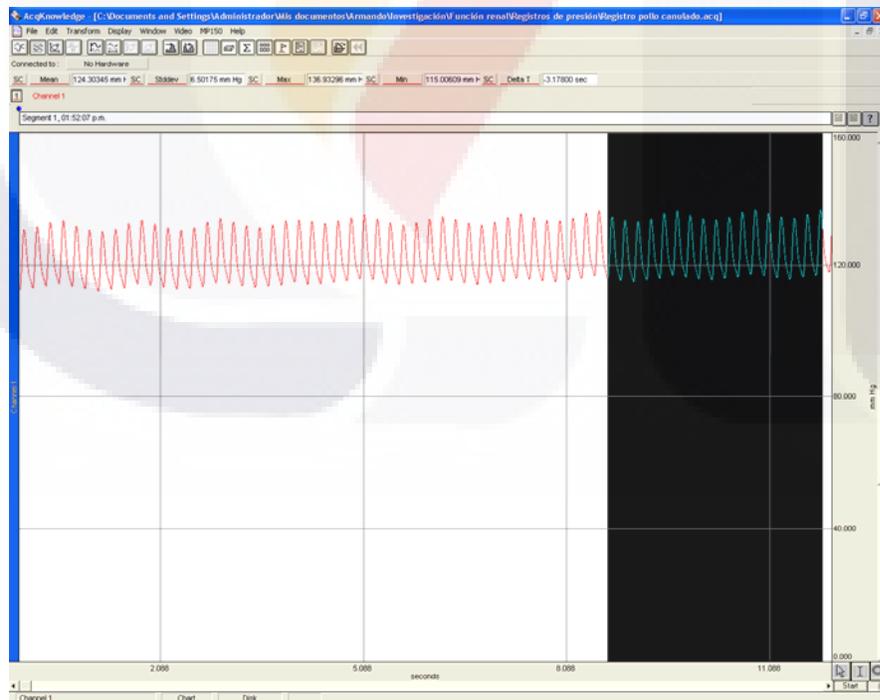


Figura 4.1. Registro de presión arterial de una gallina control usando un método invasivo y el equipo Biopac Systems

#### 4.9.4. Obtención de curvas estándar para la cuantificación de analitos utilizados en la prueba función renal

En la figura 4.2 se muestran las curvas estándar de inulina, ácido p-aminohipúrico y fosfatos utilizadas para la cuantificación de estos analitos en plasma y orina de gallinas controles e intoxicadas con aflatoxinas.

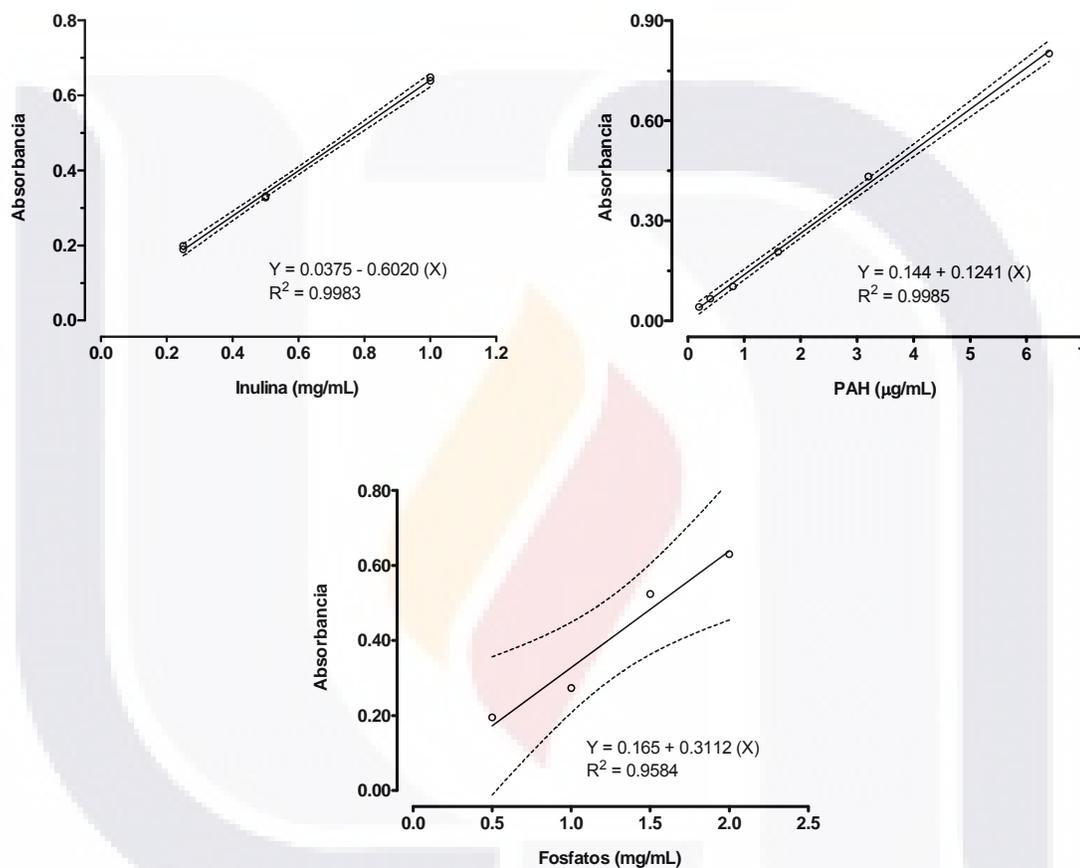


Figura 4.2. Curvas estándar para la cuantificación de inulina, ácido p-aminohipúrico y fosfatos en plasma y orina de gallinas control e intoxicadas.

Todas las curvas estándar estimaron un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) superior al 95%, lo cual es indicativo de que las ecuaciones resultantes para cada una de las variables, explican un mínimo del 95% de las observaciones o lecturas obtenidas.

## **4.10. METODOLOGÍA PARA HISTOPATOLIGÍA Y ANÁLISIS BIOQUÍMICO.**

### **4.10.1. Obtención de muestras de riñones**

La preparación de las gallinas para la obtención de muestras para análisis bioquímico y estudio histopatológico inició con una inducción al estado de anestesia utilizando pentobarbital sódico (25 mg/kg de P.C.). Se realizó un corte por línea media desde el abdomen hasta la cavidad torácica exponiendo el corazón; por el ventrículo izquierdo cardiaco se perfundió *in situ* (25 mL/min) 120 mL de una solución lavadora (buffer de fosfatos pH 7.4, heparina 500 U/L, procaína 1.0 g/L), realizando un corte en las venas cava en su desembocadura a la aurícula derecha para desalojar la sangre circulante y la solución lavadora. Una vez terminada la perfusión, se extrajeron los riñones y se registró su peso. Se tomó el riñón derecho de cada ave y se conservó en una solución fijadora (100 mL de formaldehído al 37%, 900 mL de agua destilada, 4.0 g/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 6.5 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4).

### **4.10.2. Técnica histológica para microscopía óptica**

Una vez obtenidos los riñones de las gallinas control e intoxicadas, para el estudio histopatológico de los mismos se desarrolló la técnica descrita por Prophet (1994) cuya secuencia del proceso se describe:

Se tomó una muestra del lóbulo renal caudal de las gallinas control e intoxicadas de aproximadamente 1.0 cm de largo y de 5.0 mm de grosor, la cual fue procesada en un Histoquinet (Leica TP 1020, Alemania). Se realizó un lavado del tejido renal en un contenedor con agua destilada. La muestra de riñón se sometió a un proceso de deshidratación en alcohol etílico absoluto anhidro a diferentes concentraciones (un contenedor con alcohol al 80%, dos contenedores con alcohol al 96% y tres contenedores con alcohol al 100%). Posteriormente el tejido renal se aclaró con xilol (un contenedor con alcohol etílico y xilol en partes iguales y posteriormente dos contenedores con xilol). La muestra de tejido renal fue infiltrada con parafina líquida (punto de fusión de 56 °C) en dos contenedores a

presión atmosférica normal. Durante todo el proceso, las muestras permanecieron una hora en cada uno de los contenedores. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en un infiltrador conectado a una bomba de vacío para asegurar una infiltración más completa de la parafina líquida. Después de la infiltración con parafina, el tejido fue incluido en un bloque de parafina utilizando un centro de embebido (Leica EG1150H) y un enfriador (Leica EG 1150C). Del bloque obtenido, se realizaron cortes histológicos de 5.0  $\mu\text{m}$  de grosor usando un microtomo de rotación (Leica RM 2125). Los cortes fueron extendidos en un baño de agua caliente ( $50.0 \pm 5.0$  ° C) y capturados en un portaobjetos, los cuales fueron secados en una estufa a temperatura de 60° C durante 24 horas.

La coloración de los cortes histológicos se realizó en un teñidor lineal semiautomático (Leica ST 4040), conformado por 27 contenedores con las siguientes soluciones: cuatro contenedores con xilol, dos contenedores con alcohol etílico absoluto anhidro al 100%, dos contenedores con alcohol etílico absoluto anhidro al 96%, un contenedor con alcohol etílico absoluto anhidro al 80%, un contenedor con agua destilada, dos contenedores con hematoxilina, dos contenedores con agua destilada, un contenedor con agua saturada con carbonato de Litio, un contenedor con agua destilada, un contenedor con alcohol etílico absoluto anhidro al 96%, dos contenedores con eosina amarillenta, dos contenedores con alcohol etílico absoluto anhidro al 96%, tres contenedores con alcohol etílico absoluto anhidro al 100% y finalmente tres contenedores con xilol. Los cortes permanecieron un minuto en cada uno de los contenedores. Terminada la tinción, el paso final fue montar el corte histológico en un cubreobjetos utilizando resina como fijador.

#### **4.10.3 Obtención de curvas estándar para la cuantificación de analitos utilizados en cuantificación de los parámetros bioquímicos.**

En la figura 4.3 se presentan las curvas estándar para la cuantificación de la concentración de GSH y proteínas totales, así como la actividad enzimática específica de GGT y GST en tejido renal de las gallinas sometidas a experimentación.

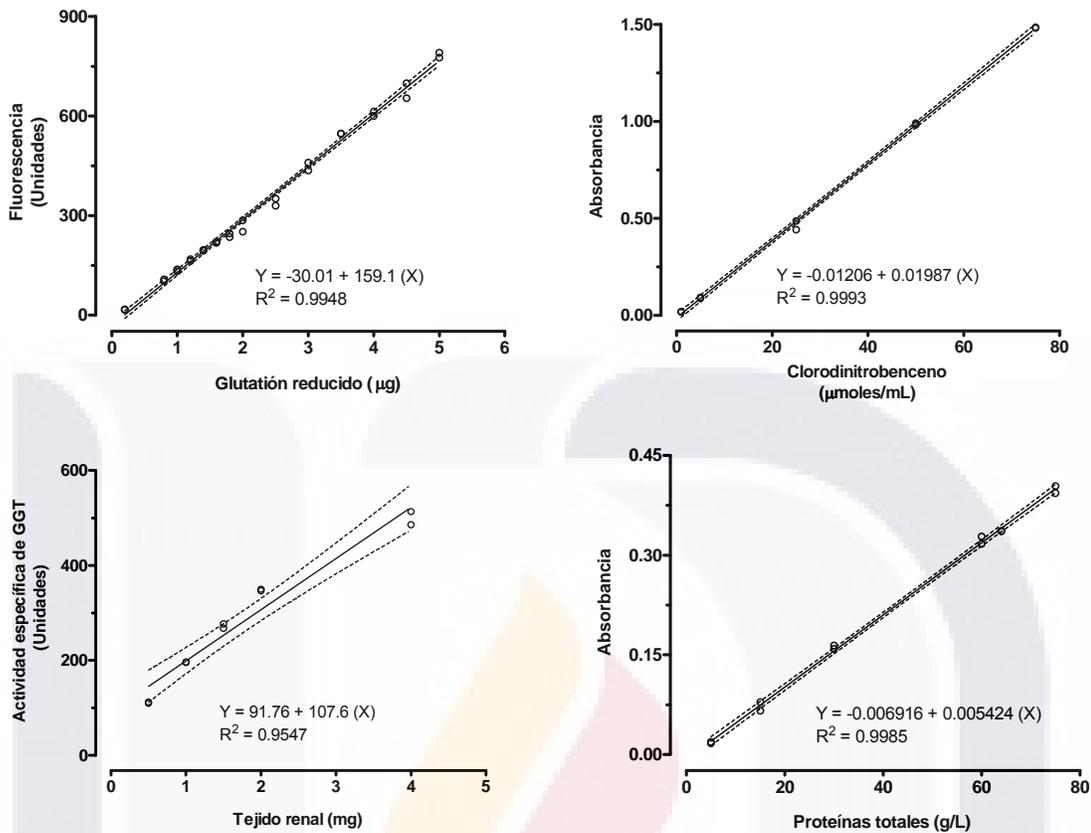


Figura 4.3. Curvas estándar para la cuantificación de Glutión reducido, actividad específica de transferasa de glutación y de transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo y proteínas totales en tejido renal de gallinas control e intoxicadas.

Todas las curvas estándar estimaron un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) superior al 95%, lo cual es indicativo de que las ecuaciones resultantes para cada una de las variables, explican un mínimo del 95% de las observaciones o lecturas obtenidas.

#### 4.10.4. Cuantificación de glutación reducido

Para la cuantificación de este parámetro bioquímico se desarrollaron los procedimientos descritos por Cohn y Lyle (1966) y Hissin e Hilf (1976) que se detalla a continuación.

Se homogeneizó una muestra de 250 mg del tejido (Homogenizer Porter Glas-Col model 099C K54) en una solución buffer de fosfatos (14.19 g/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.86 g de EDTA, pH 8.0) adicionando posteriormente 1.0 mL de ácido metafosfórico al 25%. Las muestras se conservaron en congelación a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  (ULT Freezer Thermo Scientific) hasta la realización del análisis.

El homogeneizado de tejido renal fue centrifugado (5000 rpm durante 30 min) tomándose 0.5 mL del sobrenadante de cada muestra y se diluyó en 4.5 mL de buffer de fosfatos (pH 8.0). A partir de la mezcla anterior se tomó 0.1 mL para realizar una nueva mezcla con 1.8 mL de buffer de fosfatos (pH 8.0) y 0.1 mL de ortoortaldehído (OPT 0.1% p/v) para luego incubarlo durante 15 minutos a temperatura ambiente (Hissin and Hilf, 1976). Finalmente se efectuó la lectura utilizando un espectrofluorómetro (Perkin Elmer LS50B, Norfolk, CA, USA), con una longitud de onda de 350 nm de excitación y 420 nm de emisión.

#### **4.10.5. Cuantificación de proteínas totales**

El fundamento del método radica en que la proteína presente en la muestra reacciona con los iones Cobre (II) en medio alcalino, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría (Gornall *et al.*, 1949).

Para este análisis se utilizó un reactivo I (Acetato de cobre II 6 mmol/L, Yoduro de potasio 12 mmol/L Hidróxido sódico 1.15 mol/L, detergente; Biosystems S. A.) y un reactivo II (Patrón de proteína: albúmina bovina; Biosystems S. A.).

El procedimiento para el manejo de las muestras y reactivos se realizó en tubos de ensaye de la siguiente manera:

<b>Reactivo</b>	<b>Blanco</b>	<b>Patrón</b>	<b>Muestra</b>
Agua destilada	20 $\mu\text{L}$	–	–
Reactivo II	–	20 $\mu\text{L}$	–
Muestra	–	–	20 $\mu\text{L}$
Reactivo I	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

Los tubos fueron agitados e incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente se realizó la lectura tanto de las muestras como del blanco y del patrón empleando un espectrofotómetro (Varian DMS-80, Varian Ass., Inc., Australia) con una longitud de onda de 545 nm.

#### **4.10.6. Cuantificación de la actividad de las transferasas de glutatión**

Para la cuantificación de este parámetro se utilizó el procedimiento descrito por Habig *et al.* (1974). Cada muestra se preparó por duplicado, para lo cual se utilizaron tubos de ensaye en los que se preparó una mezcla con 2.3 mL de buffer de fosfatos (pH 6.5), 500  $\mu$ L de GSH, 100  $\mu$ L de homogeneizado y 100  $\mu$ L de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), este último se agregó cuando la mezcla se encontraba en agitación. Enseguida la mezcla se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente para que se llevara a cabo la reacción. Finalmente la lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Varian DMS-80, Varian Ass., Inc., Australia) a una absorbancia de 340 nm.

#### **4.10.7. Cuantificación de transpeptidasa de gama-glutamilo**

La GGT cataliza la transferencia del grupo  $\gamma$ -glutamilo de la  $\gamma$ -glutamilo-3-carboxi-4-nitroanilida a la glicilglicina, liberando 3-carboxi-4-nitroanilina (IFCC, 1983; Beleta and Gella, 1990).

Para este análisis se preparó un reactivo C, que consistió en la mezcla del reactivo A (Glicilglicina 206.25 mmol/L, Hidróxido sódico 130 mmol/L, pH 7.9; Biosystems S. A.) más el reactivo B ( $\gamma$ -Glutamilo-3-carboxi-4-nitroanilida 32.5 mmol/L; Biosystems S. A.).

La reacción fue realizada en tubos de ensaye a temperatura ambiente de la siguiente manera: 1.0 mL del reactivo C y 0.1 mL de muestra, enseguida se agitó y se procedió a registrar la lectura de la absorbancia inicial y la lectura al minuto, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro (Varian DMS-80, Varian Ass., Inc., Australia) con una longitud de onda de 405 nm.

La actividad catalítica de GGT en la muestra, se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\Delta A / \text{min} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s} = U / L$$

Donde:

$\Delta A / \text{min}$  = Cambio de la absorbancia por minuto a 405 nm

$V_t$  = Volumen total de reacción

$10^6$  = Constante

$\epsilon$  = Coeficiente de absorción molar

$L$  = Paso de luz

$V_s$  = Volumen de muestra

$U/L$  = Unidades por litro

#### 4.11. DISEÑO EXPERIMENTAL

Del total de 80 aves, se formaron de manera completamente aleatoria (Snedecor y Cochran, 1967), 4 grupos experimentales (n=20) en un arreglo factorial de tratamientos (Cuadro 4.1) que incluyó cuatro concentraciones de aflatoxinas (0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg / kg de alimento), los cuales se sometieron a una prueba de función renal (Martínez *et al.*, 2006) en las semanas 0, 17, 42 y 67 de intoxicación de las gallinas.

*Tabla 4.1 Distribución de tratamientos en las gallinas de postura sometidas a intoxicación crónica con aflatoxinas.*

Tiempo		Concentración de aflatoxinas (mg/kg de alimento)			
Edad (semanas)	intoxicación (semanas)	0	0.5	1.0	1.5
13	0	5	5	5	5
30	17	5	5	5	5
55	42	5	5	5	5
80	67	5	5	5	5
Total de aves		20	20	20	20

#### 4.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El modelo estadístico para este trabajo se ajustó a un completamente al azar con un arreglo factorial 4x4 donde los datos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con el módulo de modelos lineales generales del software *Statistical Analysis System* (SAS, 1999). Se realizó una comparación de medias de tratamientos por la prueba estudentizada de Tukey considerando un nivel de probabilidad  $\leq 0.05$ . El modelo estadístico factorial para el análisis de resultados se describe como:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- Y<sub>ij</sub> = variable
- $\mu$  = media general respuesta
- A<sub>i</sub> = efecto del factor A a nivel i (Concentración de AF)
- B<sub>j</sub> = efecto del factor B a nivel j (Tiempo de intoxicación)
- Ab<sub>ij</sub> = interacción entre el factor A y el factor B
- $\varepsilon_{ij}$  = error aleatorio de cada uno de los factores

## 5. RESULTADOS

### 5.1. PARÁMETROS FÍSICOS

#### 5.1.1. PESO CORPORAL

Para esta variable, el ANOVA del modelo factorial fue significativo para los factores de concentración de aflatoxinas y tiempo de intoxicación ( $P < 0.05$ ), pero no para la interacción de los factores ( $P > 0.05$ ). El peso corporal de las gallinas intoxicadas AF mostró una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en las concentraciones de 1.0 y 1.5 mg de AF /kg de alimento en los tres tiempos de muestreo (figura 5.1 A) así como también en el tiempo del período de intoxicación en las concentraciones de 1.0 y 1.5 (figura 5.1 B). Con respecto al tiempo de intoxicación, la concentración de 0.5 mg de AF /kg de alimento, no presentó diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en comparación con el grupo control.

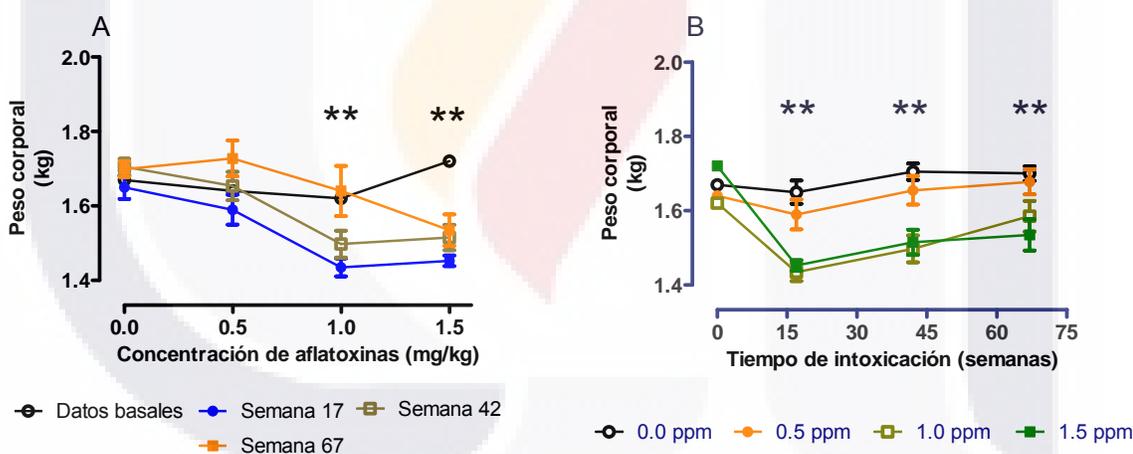


Figura 5.1. Peso corporal de gallinas intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo (Panel B). \*\*= diferencia altamente significativa ( $P > 0.05$ ). Interacción AF por Tiempo  $P < 0.05$ .

#### 5.1.2. PESO RELATIVO DE LOS RIÑONES

Para esta variable, el ANOVA del modelo factorial fue significativo ( $P < 0.05$ ) para los factores de concentración de aflatoxinas, tiempo de intoxicación y para la

interacción de los dos factores. En el peso relativo de los riñones (PRR) se observó una disminución en este parámetro, de todos los grupos que conformaron el estudio, representando un efecto significativo del factor tiempo ( $P < 0.05$ ; figuras 5.2 A y B). Pero en la semana 67, las gallinas que recibieron 1.0 mg de AF/kg de alimento mostraron un incremento del PRR. La interacción de la concentración de aflatoxinas con el tiempo de intoxicación fue significativa ( $P < 0.05$ ).

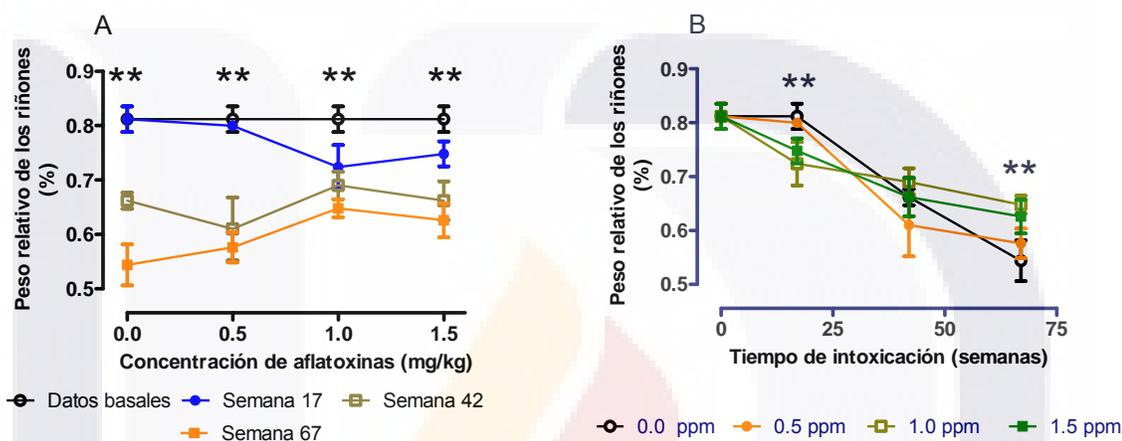


Figura 5.2. Peso relativo de los riñones de gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo (Panel B). \*\*= diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ). Interacción AF por Tiempo  $P < 0.05$ .

## 5.2. PARÁMETROS DE FUNCIÓN RENAL

### 5.2.1. PRESIÓN ARTERIAL

En relación con este parámetro, el ANOVA del modelo factorial no mostró significancia ( $P > 0.05$ ) en ninguno de sus componentes. Para esta variable no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las concentraciones de AF (0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg / kg de alimento), período de intoxicación (17, 42 y 67 semanas) ni en la interacción de la concentración de AF por el tiempo de administración del alimento contaminado (tabla 5.1).

Tabla No. 5.1. Análisis de la presión arterial media en gallinas

AF (mg/kg)	Presión arterial media (mm de Hg; media ± EE)
Referencia	91.3*- 172.0**
0.00	137 ± 18.1
0.50	118 ± 24.9
1.00	129 ± 12.3
1.50	131 ± 22.1
<i>P</i>	0.89
CV	19.34

\*Pollo de engorda anestesiado con barbitúricos (Martínez et al., 2005)

\*\* Gallina Leghorn blanca sin anestesiar (Vogel y Sturkie, 1963)

CV = Coeficiente de variación

### 5.2.2. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE ANALITOS

El ANOVA del modelo factorial para esta variable fue significativo ( $P < 0.05$ ), para la interacción de los dos factores bajo estudio. Los valores medios obtenidos de la concentración en plasma de inulina, ácido p-amino hipúrico, sodio, potasio, calcio y fosfatos se muestran en la Tabla 5.2. Al comienzo del período de intoxicación y hasta la semana 17, todos los grupos de tratamiento tuvieron una concentración similar de los analitos estudiados ( $P > 0.05$ ), pero el consumo prolongado de AF provocó una disminución significativa de calcio y fosfatos ( $P < 0.05$ ) hasta las semanas 42 y 67 en las gallinas que recibieron 1.0 y 1.5 mg de AF /kg de alimento.

Tabla 5.2. Concentraciones plasmáticas de inulina, ácido p-aminohipúrico, sodio, potasio, calcio y fosfatos de gallinas del grupo control e intoxicadas con tres concentraciones de concentración de aflatoxinas (media  $\pm$  E.E)

Grupos AF (mg/kg)	Analito					
	Inulina (mg/mL)	PAH ( $\mu$ g/mL)	Sodio (mmol/L)	Potasio (mmol/L)	Calcio (mmol/L)	Fosfatos ( $\mu$ g/mL)
<b>Muestreo semana 17</b>						
0.0	22.7 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	33.2 $\pm$ 2.10 <sup>a</sup>	170 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	3.9 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	212 $\pm$ 10.8 <sup>a</sup>
0.5	21.6 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>	36.4 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	168 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	210 $\pm$ 19.2 <sup>a</sup>
1.0	19.4 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	34.5 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	164 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.87 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	242 $\pm$ 21.9 <sup>a</sup>
1.5	22.4 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	30.8 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	172 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	242 $\pm$ 13.5 <sup>a</sup>
$\alpha$	0.10	0.09	0.11	0.56	0.12	0.37
<b>Muestreo semana 42</b>						
0.0	25.7 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	31.0 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	168 $\pm$ 14.5 <sup>a</sup>	6.4 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	225 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>
0.5	26.5 $\pm$ 1.91 <sup>a</sup>	32.2 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	177 $\pm$ 13.1 <sup>a</sup>	5.7 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	3.1 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	230 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>
1.0	27.5 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	29.0 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	191 $\pm$ 10.0 <sup>a</sup>	5.2 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	2.8 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	167 $\pm$ 7.1 <sup>b</sup>
1.5	29.7 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	28.3 $\pm$ 1.94 <sup>a</sup>	173 $\pm$ 8.6 <sup>a</sup>	6.2 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	107 $\pm$ 15.1 <sup>c</sup>
$\alpha$	0.29	0.08	0.09	0.11	0.02	0.01
<b>Muestreo semana 67</b>						
0.0	20.7 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	28.0 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	162 $\pm$ 11.8 <sup>a</sup>	6.8 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	198 $\pm$ 16.5 <sup>a</sup>
0.5	24.6 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>	30.2 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	181 $\pm$ 10.7 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	213 $\pm$ 14.8 <sup>a</sup>
1.0	23.5 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>	29.0 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	171 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>	6.2 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	2.4 $\pm$ 1.35 <sup>b</sup>	158 $\pm$ 17.1 <sup>b</sup>
1.5	27.7 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>	26.8 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	163 $\pm$ 11.6 <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	164 $\pm$ 19.4 <sup>b</sup>
$\alpha$	0.37	0.28	0.19	0.21	0.04	0.03

a-c = Literales diferentes en las columnas son diferentes significativamente ( $P < 0.05$ )

### 5.2.3. FLUJO PLASMÁTICO RENAL

En relación con los parámetros hemodinámicos, el ANOVA del modelo factorial para esta variable, no fue significativo ( $P > 0.05$ ) para ninguno de sus componentes. Se puede apreciar en la Tabla 5.3, que el flujo plasmático renal no fue modificado por las dosis de AF administradas, por el tiempo de consumo del tóxico ni por la interacción de estos dos factores ( $P > 0.05$ ).

Tabla 5.3. Flujo plasmático renal (FPR; media  $\pm$  EE) de gallinas con diferentes concentraciones de concentración de aflatoxinas

Concentración de aflatoxinas (mg/kg de alimento)	FPR por semana de intoxicación (mL/min/kg PV)		
	17	42	67
0.0	27.9 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	23.8 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	26.7 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>
0.5	25.2 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	27.5 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	24.2 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>
1.0	25.1 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	23.6 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	27.3 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>
1.5	21.2 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	24.6 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>	24.2 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>

*a= Literales iguales en las columnas no son diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ) Interacción AF por Tiempo  $P > 0.05$ .*

#### 5.2.4. TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR

En el análisis estadístico para esta variable, el ANOVA del modelo factorial fue significativo ( $P < 0.05$ ) para los factores de concentración de aflatoxinas, tiempo de intoxicación y para la interacción de los dos factores. La interacción de la concentración de AF y la duración del tratamiento con las toxinas modificó de manera negativa y significativamente ( $P < 0.05$ ) éste parámetro desde la semana 17 de intoxicación, la TFG de las gallinas en todos los tratamientos con AF disminuyó dos veces en las gallinas del grupo que recibió 1.0 mg/kg de alimento en la semana 42, y hasta en tres veces con las concentraciones de 1.0 y 1.5 mg de AF /kg de alimento con referencia al grupo control (figura 5.3 B). En la semana 67, la TFG muestra una tendencia a la disminución en las gallinas que recibieron las concentraciones más altas de AF, mientras que las que consumieron 0.5 mg de AF /kg de alimento, al parecer, muestran una estabilización de este parámetro (figura 5.3 A).

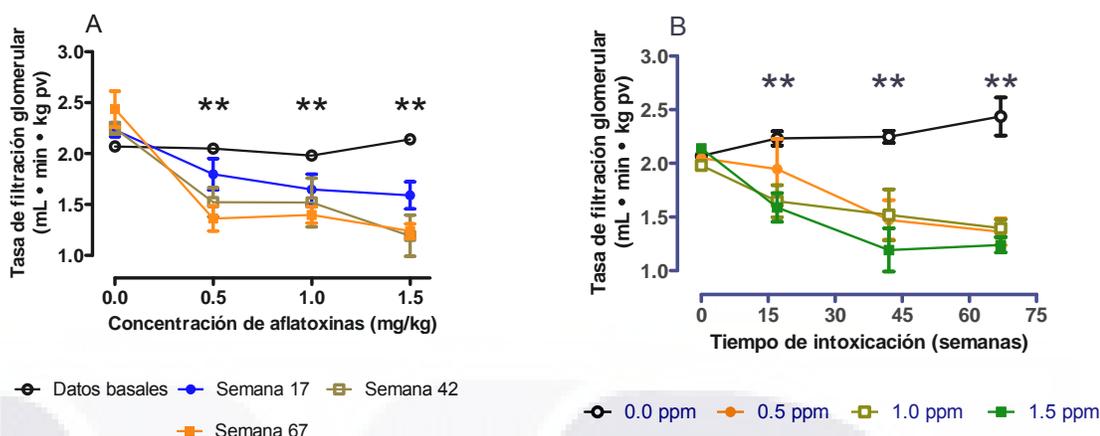


Figura 5.3. Tasa de filtración glomerular en gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo (Panel B). \*\*= diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ). Interacción AF por Tiempo  $P < 0.05$ .

### 5.2.5. EXCRECIÓN FRACCIONAL DE POTASIO

El ANOVA del modelo factorial para esta variable, no resultó significativo ( $P > 0.05$ ) para ninguno de sus componentes. La excreción fraccional de potasio no fue modificada ( $P > 0.05$ ) con el consumo de AF en las tres concentraciones administradas en el alimento durante las tres semanas seleccionadas para el muestreo (tabla 5.4).

Tabla 5.4. Excreción fraccional de potasio (EFK) de gallinas control e intoxicadas con tres diferentes concentraciones de concentración de aflatoxinas (media  $\pm$  SE)

Concentración de aflatoxinas (mg/kg de alimento)	EFK por semana (% / kg P.V.)		
	17	42	67
0.0	11.3 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	13.8 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	12.9 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>
0.5	9.5 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	13.0 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
1.0	13.5 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	10.5 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>
1.5	10.7 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	12.3 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	12.5 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>

a= Literales iguales en las columnas no son diferentes significativamente ( $p < 0.05$ )  
Interacción AF por Tiempo  $P > 0.05$ .

### 5.2.6. EXCRECIÓN FRACCIONAL DE CALCIO

El ANOVA del modelo factorial fue significativo para la concentración de aflatoxinas, tiempo de intoxicación y para la interacción de ambos factores ( $P < 0.05$ ). La excreción renal de calcio se incrementó significativamente ( $P < 0.05$ ) por la interacción de los factores que condicionaron la ingestión de la toxina en el alimento. En la semana 17 de intoxicación, las gallinas que consumieron 1.0 mg de AF /kg de alimento, eliminaron mayores cantidades de calcio en la orina que los otros grupos (figuras 5.5 A y 5.5 B); para la semana 42, en todos los grupos intoxicados con AF, el calcio fue excretado hasta tres veces más que en el grupo control ( $P < 0.05$ ). En la semana 67, la excreción de calcio se manifestó de manera similar a la observada en la semana 42. La duración de la intoxicación influyó significativamente ( $P < 0.05$ ) la excreción de calcio, de tal forma que, a la semana 67 de intoxicación, el grupo de 1.5 mg de AF /kg de alimento aumentó hasta tres veces los valores observados en la semana 17, mientras que el de 1.0 mg de AF /kg de alimento, sobrepasó hasta cinco veces los valores basales obtenidos al inicio del experimento. La excreción fraccional de calcio mostró en los tratamientos de 1.0 y 1.5 mg de AF /kg de alimento, una relación directa y lineal en relación a la duración del consumo de la toxina.

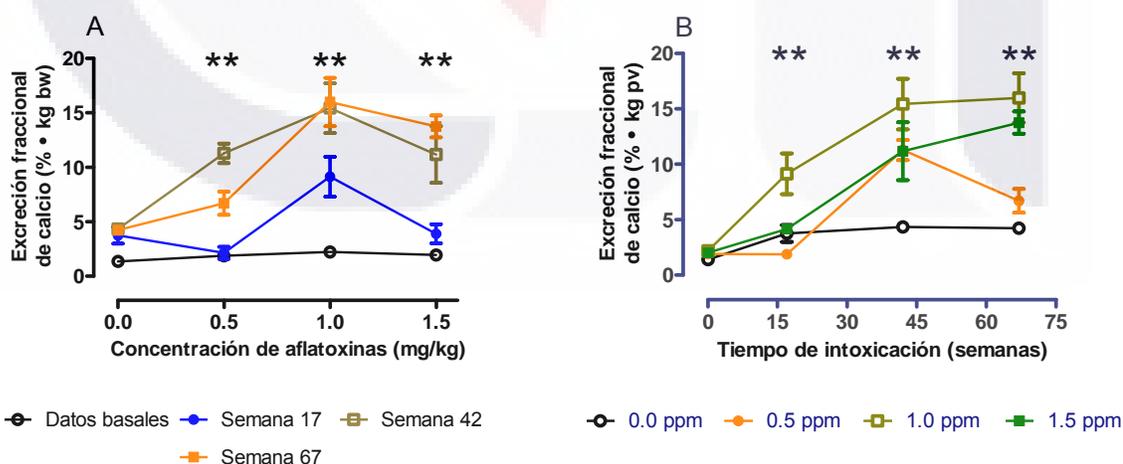


Figura 5.5. Excreción fraccional de calcio en gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo (Panel B). \*\*= diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ). Interacción AF por Tiempo  $P < 0.05$ .

### 5.2.7. EXCRECIÓN FRACCIONAL DE SODIO

En el análisis estadístico para esta variable, el ANOVA del modelo factorial fue significativo ( $P < 0.05$ ) para los factores de concentración de aflatoxinas, tiempo de intoxicación y para la interacción de los dos factores. Al igual que en la excreción fraccional de calcio, el manejo renal de sodio se vio afectado significativamente ( $P < 0.05$ ) por la interacción de la cantidad de AF consumida y la duración de la intoxicación. En la semana 17, la excreción de sodio se incrementó en las concentraciones de 1.0 y 1.5 mg AF/ kg de alimento, mientras que para las semanas 42 y 67, todos los grupos intoxicados con AF eliminaron en la orina una mayor cantidad de sodio que el grupo control ( $P < 0.05$ ), evidenciando una relación directa y lineal entre la excreción de sodio, el aumento en el consumo de AF y la duración de la intoxicación. El aumento de la excreción de sodio debido a la dosis y tiempo de exposición AF podría considerarse un efecto de toxicidad crónica por AF.

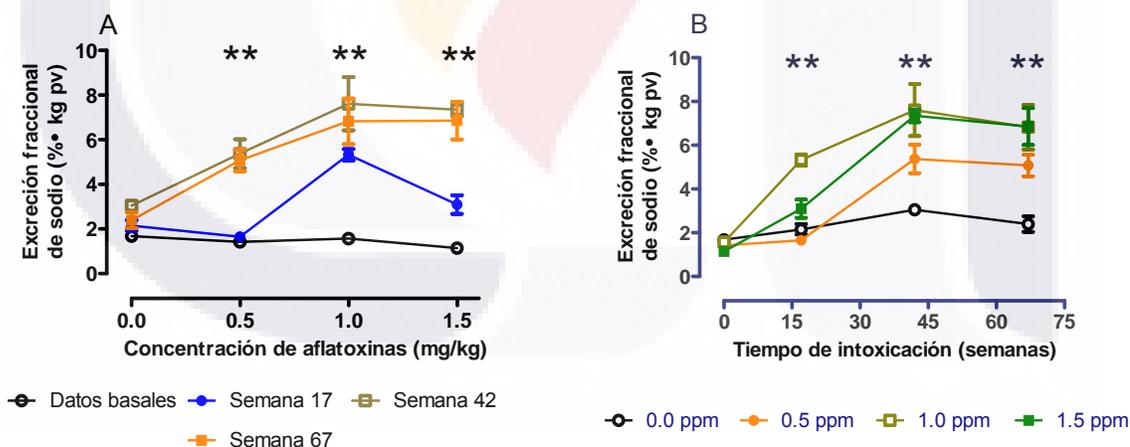


Figura 5.6. Excreción fraccional de sodio en gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo (Panel B). \*\*= diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ). Interacción AF por Tiempo  $P < 0.05$ .

### 5.2.8. EXCRECIÓN FRACCIONAL DE FOSFATOS

En el análisis estadístico para esta variable, el ANOVA del modelo factorial fue significativo ( $P < 0.05$ ) para la concentración de aflatoxinas y el tiempo de intoxicación, pero no para la interacción de ambos factores ( $P > 0.05$ ). Las gallinas que consumieron las AF, durante los tres tiempos de intoxicación, eliminaron por vía renal mayores cantidades de fosfatos en relación con las gallinas control (figura 5.7 A).

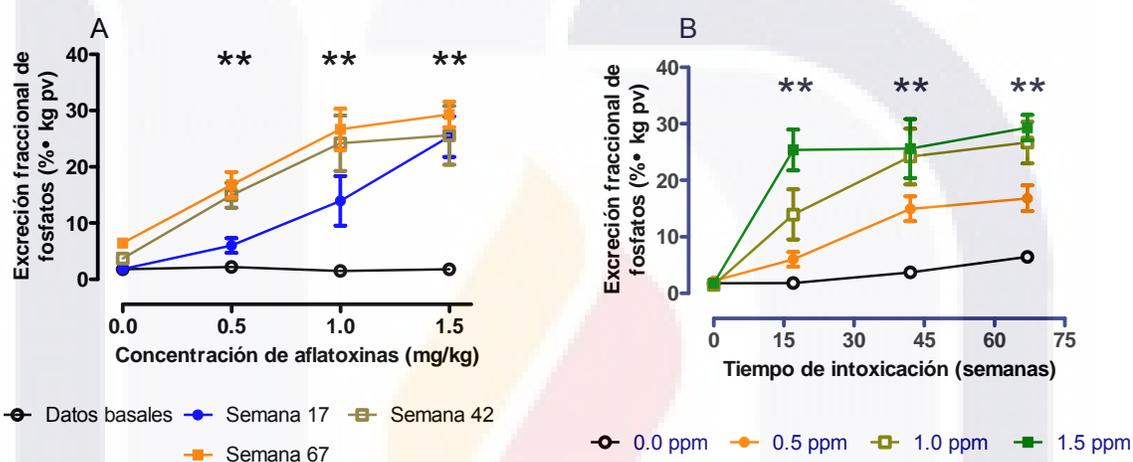


Figura 5.7. Excreción fraccional de fosfatos en gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo (Panel B). \* = diferencia significativa y \*\* = diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ). Interacción AF por Tiempo  $P > 0.5$ .

### 5.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

#### 5.3.1. Proteínas totales en tejido renal

En el análisis estadístico, el ANOVA del modelo factorial fue significativo para los factores de concentración de aflatoxinas, tiempo de intoxicación e interacción de los dos factores ( $P < 0.05$ ). La interacción de la concentración de AF con el tiempo de intoxicación, modificó significativamente ( $P < 0.05$ ) la concentración de proteínas totales en el tejido renal. Se observó un incremento significativo en el

grupo de 0.0 mg de AF /kg de alimento correspondiente a la edad de las gallinas, y una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en las aves que recibieron 1.0 y 1.5 mg AF por kg de alimento en la semana 42 y para las tres concentraciones de AF en la semana 67 de intoxicación (figura 5.3 A). El tiempo de intoxicación fue significativo ( $P < 0.05$ ) en la semana 42 para las concentraciones de 1.0 y 1.5 mg de AF/kg de alimento y en la semana 67 para los tres tratamientos con AF (figura 5.3 B).

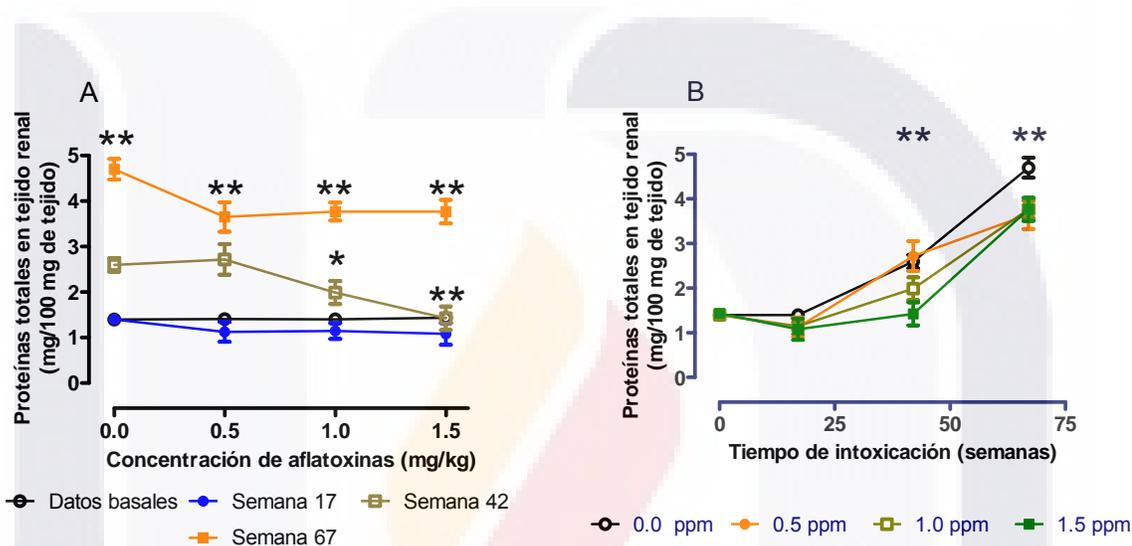


Figura 5.3. Concentración de proteínas totales en tejido renal de gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo (Panel B). \* = diferencia significativa y \*\* = diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ). Interacción AF por Tiempo  $P < 0.05$ .

### 5.3.2. Concentración de glutatión reducido en tejido renal

En el análisis estadístico de esta variable, el ANOVA del modelo factorial fue significativo ( $P < 0.05$ ) para los factores de concentración de aflatoxinas, tiempo de intoxicación e interacción de los factores ( $P > 0.05$ ). La concentración de GSH en el tejido renal de las gallinas intoxicadas se vio significativamente disminuido en las aves que recibieron AF a las dosis de 1.0 y 1.5 mg de AF /kg de alimento en las semanas 42 y 67 del periodo de intoxicación. Se observa también un efecto significativo de la duración en la ingestión de AF ( $P < 0.05$ ) donde en las semanas

42 y 67 de intoxicación, se observó un incremento influido por la edad de las gallinas detectado en el grupo de 0.0 mg de AF /kg de alimento (figura 5.8 A). Por otro lado, se puede apreciar que en la semana 42 de intoxicación, las gallinas que recibieron las concentraciones más altas de AF en el alimento presentaron una disminución altamente significativa en relación a los tratamientos de 0.0 y 0.5 mg de AF /kg de alimento (figura 5.8 B). En la semana 67 del periodo de intoxicación no se encontraron diferencias significativas en los diferentes grupos de tratamiento con aflatoxinas ( $P < 0.05$ ).

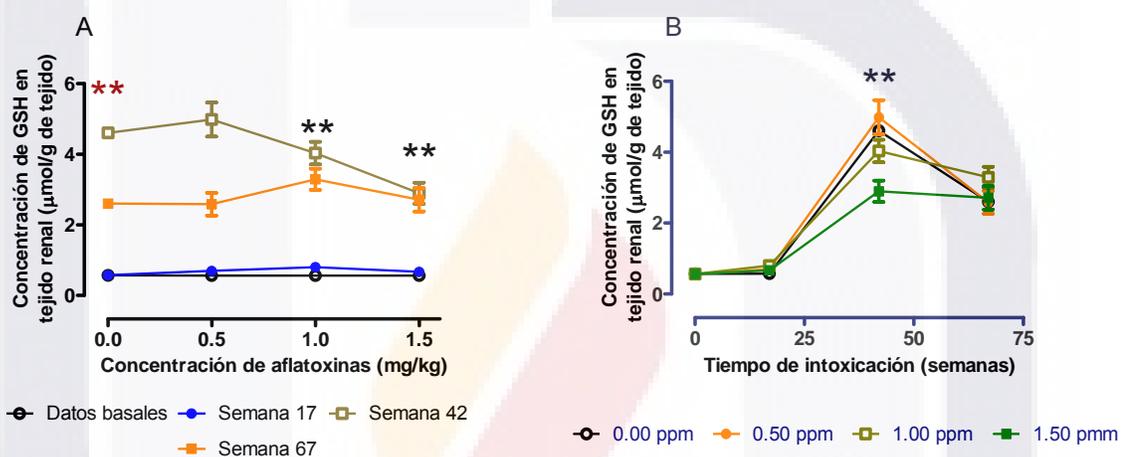


Figura 5.8. Concentración de glutatión reducido en tejido renal de gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo (Panel B). \*\*= diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ). Interacción AF por Tiempo  $P < 0.05$ .

### 5.3.3. Actividad de tranferasas de glutatión en tejido renal

En relación a la actividad de estas enzimas, el ANOVA del modelo factorial fue significativo para los factores de concentración de aflatoxinas, tiempo de intoxicación y para la interacción de los factores ( $P < 0.05$ ). Como puede observarse en la figura 5.9 A, en las semanas 42 y 67 de intoxicación, se observa este incremento lineal de la actividad enzimática en las gallinas que recibieron alimento con 1.0 y 1.5 mg de AF /kg. Se observó además que todos las concentraciones de AF /kg de alimento mostraron un incremento significativo en la

actividad de estas enzimas en función del tiempo de intoxicación ( $P < 0.05$ ; figura 5.9 B).

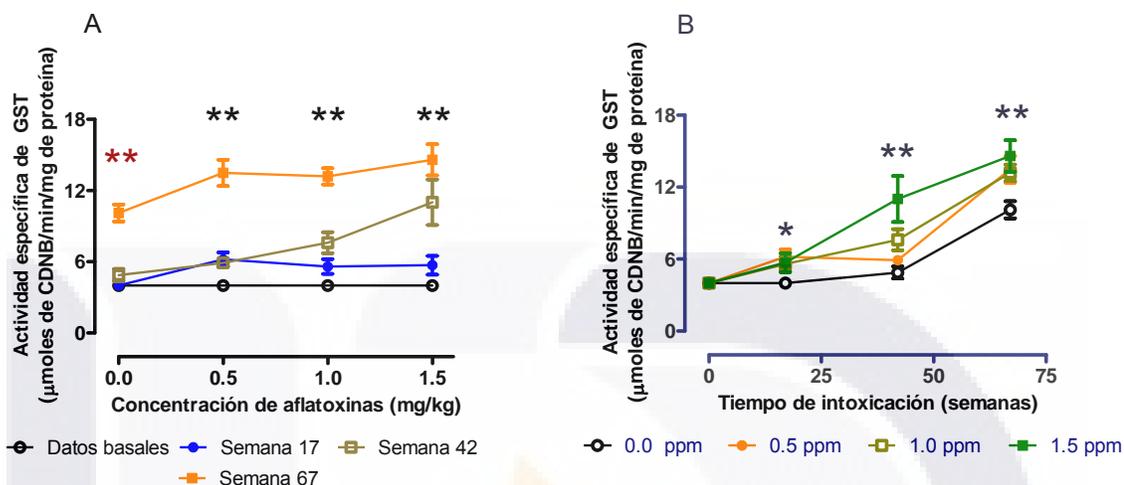


Figura 5.9. Actividad específica de la enzima transferasa de glutatión en tejido renal de gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo (Panel B). \*= diferencia significativa y \*\*= diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ). Interacción AF por Tiempo  $P < 0.05$ .

### 5.3.4. Actividad de transpeptidasa de $\gamma$ -glutamilo en tejido renal

En el caso de la actividad de la enzima transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo, el ANOVA del análisis estadístico del modelo factorial fue significativo ( $P < 0.05$ ) para los factores de concentración de aflatoxinas y tiempo de intoxicación, pero no para la interacción de los dos factores ( $P > 0.05$ ). Se puede apreciar que se presentó un aumento significativo en el tratamiento de 0.5 mg de AF por kg de alimento ( $P < 0.05$ ) a partir de la semana 17 de intoxicación (figura 5.10 A). En la semana 42, la administración de 1.0 y 1.5 mg de AF /kg de alimento indujo un incremento significativo en la actividad de esta enzima ( $P < 0.05$ ), mientras que en la semana 67 de intoxicación, solamente el consumo de 1.5 mg de AF /kg de alimento mostró incremento significativo ( $P < 0.05$ ). En el análisis por tiempo de intoxicación, en las semanas 42 y 67, la concentración de 1.5 mg de AF /kg de alimento, presentó la mayor actividad de esta enzima ( $P < 0.05$ ; figura 5.10 B).

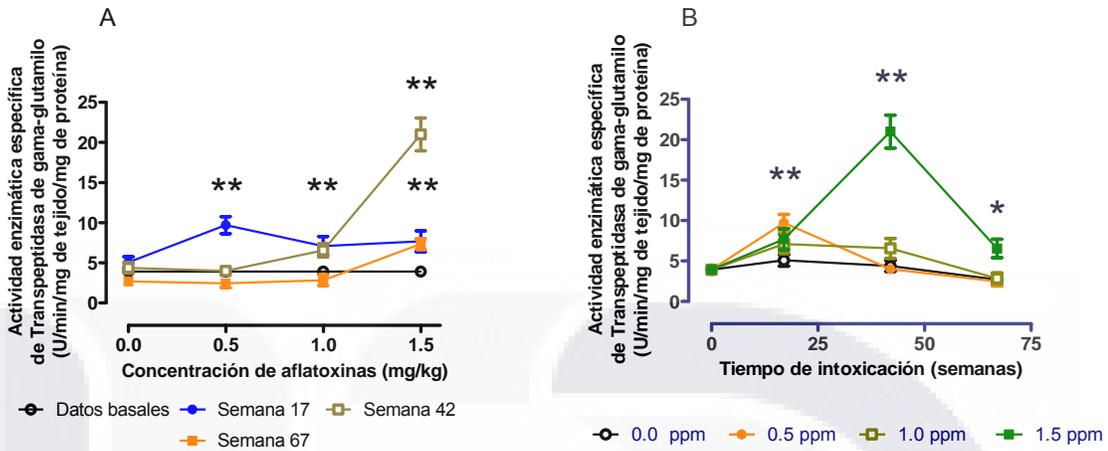


Figura 5.10. Actividad específica de la enzima transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo en tejido renal de gallinas control e intoxicadas con tres concentraciones de aflatoxinas (Panel A) y durante tres periodos de tiempo (Panel B). \*= diferencia significativa y \*\*= diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ). Interacción AF por Tiempo  $P < 0.05$ .

#### 5.4. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

En el análisis microscópico del tejido renal de las gallinas en el grupo que no recibió AF se observó un arreglo estructural característico (figura 5.11) que alcanzó una frecuencia del 88.8% de los cortes evaluados (Tabla 5.5), mientras que en las gallinas que consumieron AF sólo se detectó el arreglo estructural característico de los tejidos y células renales en un 33.3% de los cortes evaluados.

Se observaron diversos tipos de alteraciones microscópicas en tejido renal aparentemente ocasionadas por el consumo de la micotoxina suministrada. El grupo control ( $n=9$ ) presentó un riñón con infiltración linfoide ligera.

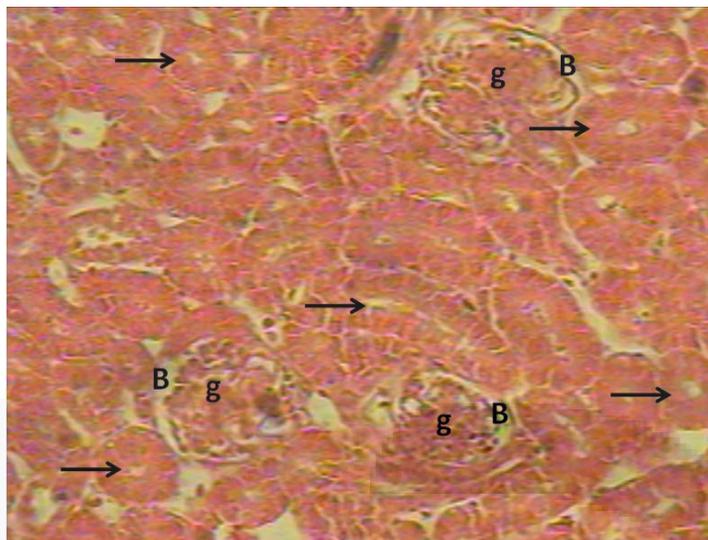


Figura No. 5.11. Aspecto normal característico de tejido renal en las gallinas del grupo control. Se puede apreciar que las estructuras renales como los glomérulos (g) y los túbulos proximales (→) se encuentran íntegros así como también las células que las integran, no hay presencia de células inflamatorias. Los espacios de Bowman (e) están bien definidos y de tamaño proporcional al del glomérulo.

En el tejido renal de las gallinas intoxicadas con AF se observó pérdida del arreglo estructural (26.0%; Tabla 5.5). También se apreció dentro de un mismo órgano tanto el incremento como la disminución del espacio de Bowman alcanzando proporciones de 52.0% y 70.4%, respectivamente (figura 5.12).

Tabla 5.5. Frecuencia de lesiones microscópicas en riñones de gallinas control e intoxicadas con aflatoxinas (%)

Hallazgo /	Concentración de AF (mg / kg alimento)	
	0.0 (n=9)	0.5 – 1.5 (n=27)
Aspecto normal característico	88.8	33.3
Pérdida de arreglo estructural	0.0	26.0
Mayor espacio entre estructuras	0.0	30.0
Aumento del espacio de Bowman	0.0	52.0
Disminución del espacio de Bowman	44.4	70.4
Material amiloide	11.1	41.0
Infiltración linfocitaria	11.1	33.3
Desprendimiento celular del borde en cepillo.	0.0	7.4
Degeneración celular	11.1	33.3
Presencia de vacuolas	0.0	7.4

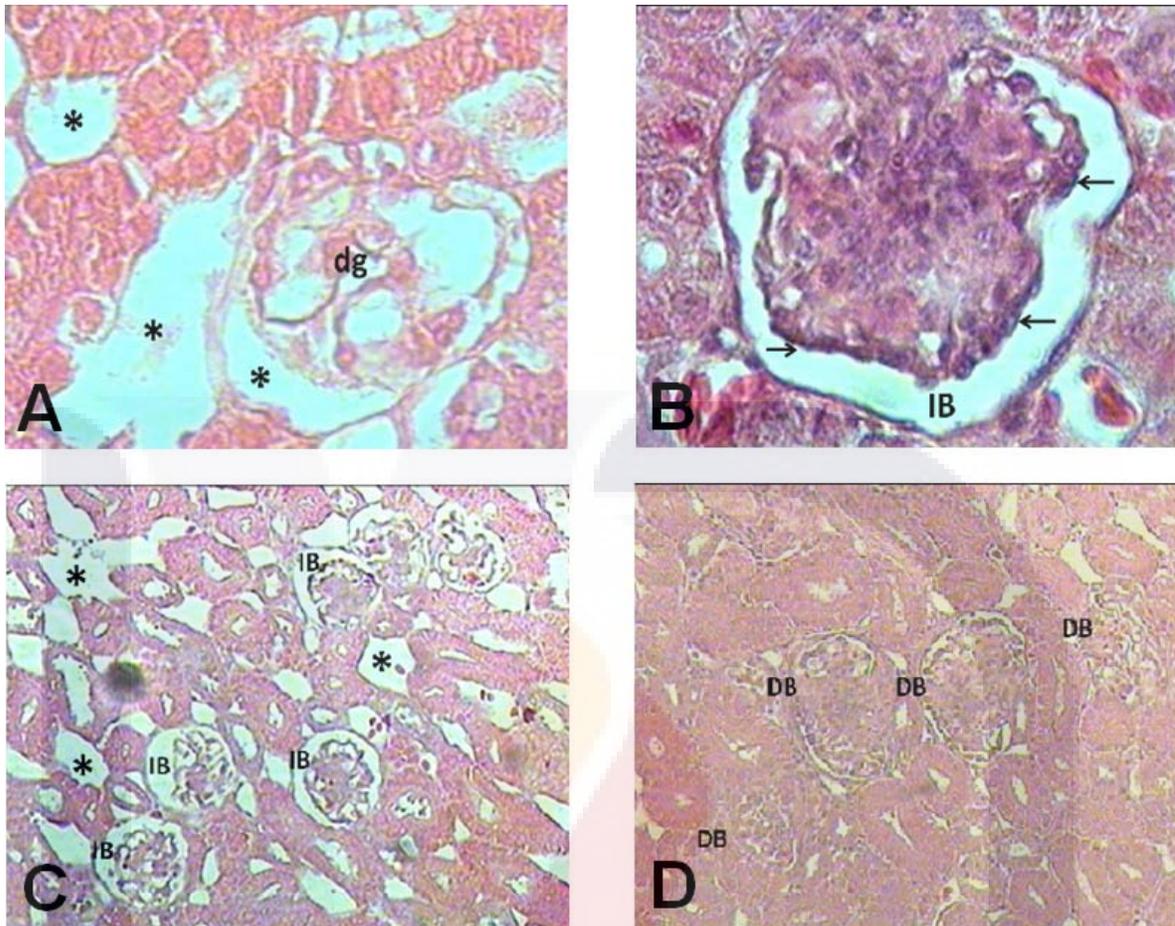


Figura No. 5.12. Hallazgos microscópicos en los riñones de las gallinas intoxicadas con aflatoxinas. Tinción H y E. Panel A) Pérdida del arreglo estructural en riñones con mayor espacio entre las estructuras (\*), degeneración glomerular (dg) X40. Paneles B y C) Incremento del espacio de Bowman (IB) y engrosamiento de la membrana basal (→) X40 y X10 respectivamente. Panel D) Glomérulos con disminución del espacio de Bowman (DB) X10.

Se presentaron focos de infiltración linfocitaria (33.0%) identificados como aglomeraciones celulares basófilas ubicadas entre los glomérulos y túbulos renales, desprendimiento celular del borde en cepillo de los túbulos renales (7.4%), amiloidosis (41.0%) identificada como un material amorfo, homogéneo y eosinofílico presente en los vasos sanguíneos y en sitios extracelulares, es decir en el área mesangial de los glomérulos y alrededor de los túbulos del riñón (figura 5.13; panel C). La glomerulonefritis fue identificada también como un acumulo de células basófilas presentes en el glomérulo (figura 5.13; panel D), así como un

engrosamiento marcado de la cápsula de Bowman, lo cual representa un sello característico de la glomerulonefritis membranoproliferativa (Maxie, 2008) y de la fibrosis intersticial, que se presenta en las enfermedades renales progresivas.

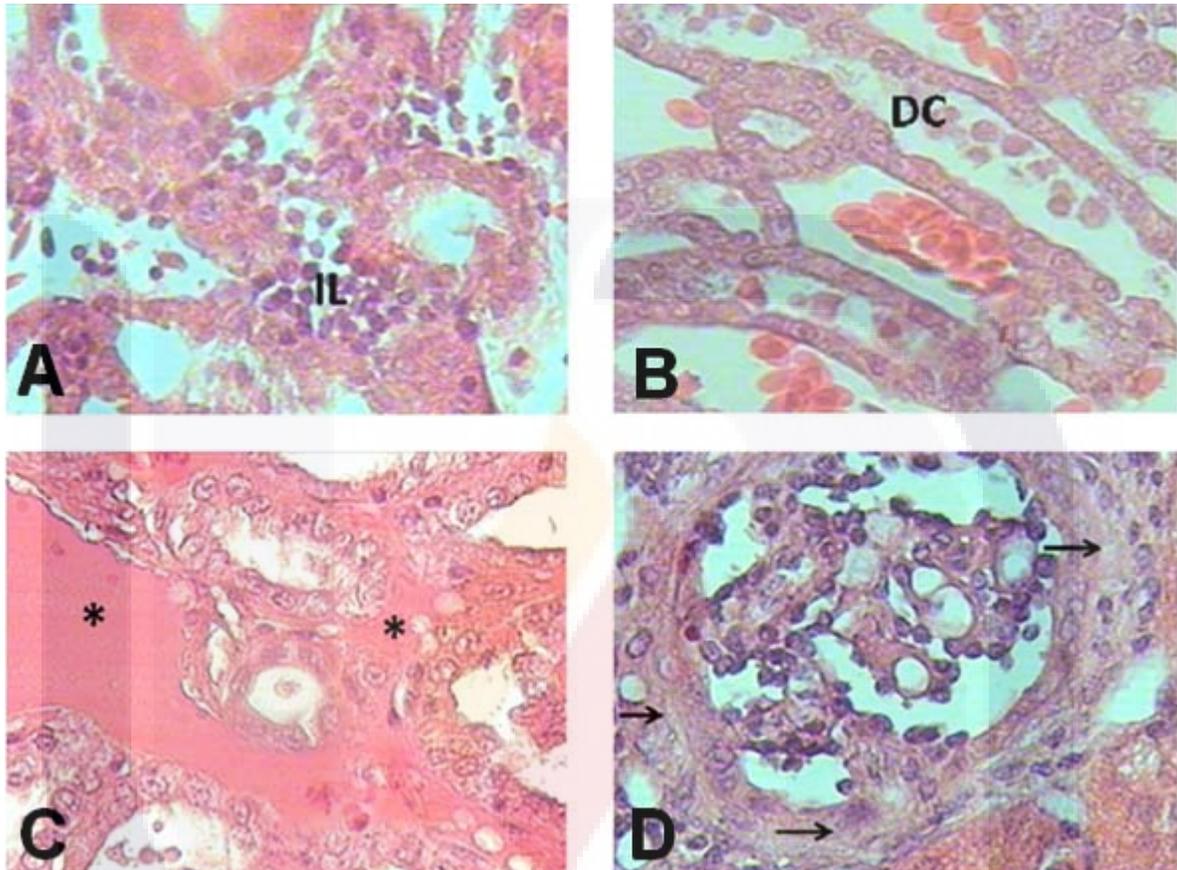


Figura No. 5.13. Hallazgos microscópicos en los riñones de las gallinas intoxicadas con aflatoxinas. Tinción H y E, X40. Panel A) Infiltración linfocitaria (IL). Panel B) Desprendimiento celular en los túbulos renales (DC). Panel C) Presencia de material amiloide entre los túbulos (\*). Panel D) Glomerulonefritis con marcado engrosamiento de la cápsula de Bowman (→).

Las lesiones renales ocurrieron con mayor frecuencia en las concentraciones más altas de AF ( $\chi^2 < 0.05$ ); la concentración de 0.5 (mg/kg) mostró una o más de las lesiones identificadas en uno de nueve riñones evaluados, mientras que las concentraciones de 1.0 y 1.5 mostraron una frecuencia de lesiones de 8/27 y 20/27, respectivamente.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. PESO CORPORAL

Nuestros resultados mostraron el efecto depresor de las AF sobre el peso corporal de las gallinas intoxicadas. Esta disminución del peso corporal de las gallinas intoxicadas es una evidencia del daño tóxico inducida por la ingestión del alimento contaminado con AF presentándose en las dosis mayores (1.0 y 1.5 mg de AF /kg de alimento) a partir de la semana 17 de intoxicación. Este resultado concuerda con trabajos previos en gallinas y pollos de engorda en intoxicaciones agudas y subagudas con AF. (Huff *et al.*, 1986; Kemal, *et al.*, 2003; Jand *et al.*, 2005; Tessari *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2008) y prueba el efecto tóxico de estas toxinas en el organismo total de la gallina.

La disminución del peso corporal puede ser explicada por el efecto negativo que tienen las AF sobre el consumo de alimento (Allameh *et al.*, 2005) y la utilización de nutrientes por el organismo, donde se encuentran reducidas en un 56% la concentración de sales biliares y en un 35% la actividad de enzimas digestivas primarias (amilasa, tripsina y lipasa), lo cual ocasiona una deficiente digestión de los nutrientes (síndrome de mala absorción) y, asociado al severo daño hepático, un pobre aprovechamiento de los carbohidratos, lípidos y proteínas absorbidas (Zaviezo, 2006; Rauber *et al.*, 2007; Yarru *et al.*, 2009; Bailey *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2006). Este efecto dañino también repercute en la producción de huevo; Fernández y colaboradores (1994), reportan una disminución significativa en la producción de huevo ocasionado por el consumo de AF (5.0 mg/kg de PV por 42 días), mientras que Hamilton y Garlich (1971) también observaron ese efecto con 1.25 µg/kg de PV de AF.

## 6.2. PESO RELATIVO DE LOS RIÑONES

La disminución progresiva observada del peso relativo de los riñones de todos los grupos de aves a lo largo del tiempo de intoxicación pudiera ser explicada por las características propias del crecimiento corporal total del ave comparadas con el crecimiento de un órgano en particular, dado que las gallinas se encontraban en periodo de desarrollo corporal y, durante este periodo, mantienen un crecimiento aditivo de todos los órganos, comparado con el crecimiento individual de los riñones que es menos intenso después de iniciado el periodo de crecimiento juvenil.

El peso de estos órganos de las gallinas disminuyó significativamente cuando se administró aflatoxinas en el alimento en las concentraciones de 1.0 y 1.5 mg /kg de PV durante las primeras 17 semanas de intoxicación, mientras que para la semana 42 este efecto no fue observado. El incremento significativo del peso relativo de estos órganos en las gallinas intoxicadas se presentó hasta la semana 67 de intoxicación en las concentraciones más altas de AF (1.0 y 1.5 mg /kg de alimento) como un efecto del tiempo de intoxicación ( $P < 0.05$ ). El efecto inicial hasta las 42 semanas de tratamiento, concuerda con los resultados de Ortatlatli *et al.* (2005) quienes no encontraron diferencias significativas en el peso relativo de los riñones de pollos intoxicados con 0.05 y 0.01 mg AF/ kg de PV durante 42 días. Se debe mencionar que nosotros utilizamos dosis más altas del tóxico y el tiempo de intoxicación fue mucho mayor.

A partir de la semana 42, se observa un incremento del peso relativo de los riñones, posiblemente causado por tratamiento con AF, siendo significativo con las concentraciones de estas toxinas de 1.0 y 1.5 mg/ kg de alimento, aunque para comprobarlo se hubiera requerido continuar el tratamiento con AF durante mayor tiempo. Este incremento también ha sido reportado frecuentemente por diversos autores (Abo-Norag *et al.*, 1995; Edrington *et al.*, 1997; Kubena *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 1998; Kubena *et al.*, 1998; Ledoux *et al.*, 1999; Raju *et al.*, 2005; Miazzo *et*

*al.*, 2005; Tung *et al.*, 1973; Huff *et al.*, 1986; Quezada *et al.*, 2000; Valdivia *et al.*, (2001).

Estos resultados sugieren que las aflatoxinas inducen un daño cuantitativo en el desarrollo renal, manifestándose como un incremento del peso relativo del órgano, en comparación con el peso total del cuerpo del ave.

### **6.3. PRESIÓN ARTERIAL**

Los datos de presión arterial obtenidos de las gallinas control (0.0 mg de AF por kg de alimento) así como en los tres concentraciones de concentración de aflatoxinas (125 - 131 mm de Hg), se encuentran dentro de lo reportado como normal para estas aves. Martínez *et al.* (2006) reportan en un experimento para cuantificar función renal en pollos de engorda intoxicados con AFB<sub>1</sub>, una presión arterial media 91.3 mm de Hg utilizando pentobarbital sódico como medio anestésico; la presión arterial media de las aves del presente estudio fue superior a los valores reportados en el trabajo referido; por lo que se puede considerar que el aporte sanguíneo renal en las gallinas estuvo dentro de las condiciones requeridas para no obstaculizar la función renal; aunado a este funcionamiento renal suficiente, los datos de TFG, FPR y la excreción fraccional de sodio fueron muy similares a los obtenidos en dicho trabajo.

En cuanto a la presión arterial media en gallinas, Vogel y Sturkie (1963) registran un valor promedio de 172 mm de Hg con la utilización de una metodología que no involucra el estado de anestesia del ave así como un método no invasivo para registrar la presión sanguínea arterial. Nuestros datos se encuentran más bajos en relación a lo que reportan, sin embargo, se debe considerar que nuestras aves fueron anestesiadas con pentobarbital sódico, el cual tiene un efecto depresor de la presión arterial.

Bajo estas condiciones, se puede afirmar que al no encontrar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, no existió interferencia de esta variable sobre la función renal analizada.

#### 6.4. CONCENTRACIÓN DE ANALITOS EN PLASMA

La homogeneidad de las aves al inicio del periodo de intoxicación, se pudo constatar por el hecho de que no existieron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de inulina, ácido p-aminohipúrico, sodio, potasio, calcio y fosfatos al comienzo del período de intoxicación, lo cual también se manifestó hasta la semana 17 de tratamiento.

El primer registro de afectación por las aflatoxinas a estos analitos fue en la semana 42, continuándose hasta la 67 del periodo de intoxicación. Se observó una disminución de calcio y fosfatos en el plasma de las gallinas que recibieron 1.0 y 1.5 mg de AF /kg de alimento. Esta reducción plasmática de los iones mencionados, pudiera ser causado por la acumulación de las AF en el organismo de las gallinas y manifestarse como un efecto crónico sobre la síntesis de los metabolitos 25-hidroxi-colecalciferol y 1,25-dihidroxi-colecalciferol en hígado y riñón lo cual se ve reflejado en una disminución en la capacidad absorción intestinal de estos iones, así como una mayor eliminación de estos iones por vía renal. La disminución de calcio y fosfatos se manifestó con un incremento en su excreción fraccional por las gallinas sometidas en este estudio a las pruebas de función renal.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Glahn *et al.* (1991) quienes proponen que la disminución de la concentración de calcio y fosfatos en el plasma puede ser un resultado directo de que las AF producen un daño tubular renal o una disminución de la absorción de calcio y fosfatos en el intestino.

Por otra parte, al no haber diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de inulina y PAH indican que las pruebas de función renal de las gallinas sometidas a diferente dosis de AF se realizó con concentraciones plasmáticas “de meseta”, requisito indispensable para evaluar adecuadamente las pruebas de funcionamiento renal.

## 6.5. FLUJO PLASMÁTICO RENAL

El flujo plasmático renal de las gallinas en todos los grupos intoxicados no presentó diferencias en los tres tiempos del período de intoxicación con referencia al grupo control, lo cual nos indica que los riñones de todas las gallinas recibieron el flujo sanguíneo adecuado para el desempeño de sus funciones. Lo cual sugiere que los mecanismos de control prerrenal e intrínseco renal (sistema renina-angiotensina) del flujo sanguíneo y la presión arterial, no se vieron afectados por la administración de las AF. Este resultado coincide con otros estudios (Glahn *et al.*, 1990 y 1991) de función renal realizados en pollo de engorda, donde este parámetro tampoco se encontró alterado por la administración subaguda de AF.

## 6.6. TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR

Las concentraciones de AF administradas a las gallinas en el actual estudio, modificaron significativamente la TFG a partir de la semana 17 de intoxicación. Este parámetro disminuyó casi un 30% en promedio en referencia a gallinas control. Esto difiere con los trabajos previos sobre intoxicaciones agudas y subagudas en pollos, donde se pone de manifiesto la capacidad de la funcionalidad del riñón (Glahn *et al.*, 1990 y 1991).

Dado que en este estudio la presión arterial y el flujo plasmático renal no fueron modificados por la ingestión de AF por las gallinas, se puede inferir que no existió algún factor pre-renal que modificara este parámetro, por lo tanto, la disminución en la TFG pudiera deberse a las alteraciones estructurales de los riñones encontradas en el estudio histopatológico de estos órganos y que incluyen glomerulonefritis con aumento del espacio de Bowman e infiltración linfocitaria y la amiloidosis.

De acuerdo con Robbins, 2006, la amiloidosis se asocia en un 40% a las glomerulonefritis (GN) crónicas, donde la sustancia amiloide se deposita en los glomérulos y en las paredes vasculares produciendo proteinuria intensa, y finalmente se desarrolla una nefropatía terminal; los riñones suelen ser de tamaño

normal o estar algo agrandados. En nuestro estudio, la amiloidosis fue encontrada en un 41% de los cortes histológicos de las gallinas intoxicadas.

El aumento en el espacio de Bowman fue encontrado en el 52 % de los cortes de riñones de gallinas analizados y se encuentra relacionado con una retracción glomerular, lo que posiblemente contribuya con una disminución del área de superficie de filtración en los glomérulos.

#### **6.7. EXCRECIÓN FRACCIONAL DE POTASIO**

La excreción fraccional de potasio no se modificó por las concentraciones de AF ingeridas, tiempo de exposición a las toxinas ni la interacción dosis-tiempo, en comparación con el grupo control. Este resultado concuerda con el estudio realizado por Glahn *et al.* (1990), donde reportan que los pollos de engorda de tres semanas de edad tratados con AF (2.0 mg/ kg de PV por día, durante 10 días consecutivos) no alteró significativamente el manejo renal de potasio. Por otra parte, Oguz *et al.* (2002) reportan que la aflatoxina añadida al alimento de pollos de engorda Ross (50 y 100 mg /kg de alimento, durante 1 a 42 días de edad) tampoco modificó el potasio sérico.

#### **6.8. EXCRECIÓN FRACCIONAL DE CALCIO**

Para la reabsorción por vía paracelular del calcio en el túbulo proximal renal se requiere de un incremento en la osmolaridad de la orina, lo que es causado mediante la reabsorción tubular de sodio y de agua (Eaton y Pooler, 2006), lo cual influye en la excreción fraccional del calcio. En nuestro estudio, paralelamente, en todas las semanas del período de intoxicación, la excreción de sodio y calcio se incrementaron de manera significativa en las gallinas que consumieron AF en el alimento; este efecto sobre el sodio, al parecer, produjo las circunstancias que condicionaron la excreción fraccional de calcio y este ión tuviera una evolución muy similar a la del sodio.

Por otro lado, Glahn *et al.* (1991) reportan que las AF provocan una disminución de metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> (25-hidroxi-colecalciferol y 1,25-dihidroxi-

colecalfiferol). Estos metabolitos se producen a partir del 7-hidrocolesterol que llega al hígado proveniente de la piel irradiada por los rayos ultravioleta del sol. El hígado transforma el 7-hidrocolesterol en 25-hidroxi-colecalfiferol y lo libera al torrente sanguíneo. El severo daño hepático de las AF posiblemente impida la síntesis y por lo tanto la disponibilidad de este metabolito. La disminución del 25-hidroxi-colecalfiferol posiblemente limitó la actividad de la enzima  $1\alpha$  hidroxilasa que se encuentra en las células del túbulo proximal de la nefrona, o bien, la degeneración celular producida por las AF en los túbulos proximales, pudo interferir con la síntesis de esta enzima, y por esta razón, se vio también afectada la síntesis del 1,25-dihidroxi-colecalfiferol.

Estos compuestos biológicos están directamente involucrados en el balance de calcio y fósforo a nivel renal mediante la reabsorción de ambos elementos en los túbulos proximales (Eaton y Pooler, 2006). Como resultado de la disminución de estos metabolitos de la vitamina  $D_3$ , el riñón no puede recuperar el calcio y los fosfatos filtrados por los glomérulos, lo que pudiera explicar el aumento de las excreciones fraccionales de estos elementos en este estudio.

#### **6.9. EXCRECIONES FRACCIONALES DE SODIO Y FOSFATO**

El manejo renal de sodio y fosfato fue afectado significativamente por el consumo de AF, dando por resultado una excreción creciente de manera directa y lineal en lo referente a la concentración de AF en el alimento consumido. Esta influencia del tiempo de la exposición, se podría considerar un efecto crónico de la toxicidad de las AF. Estos resultados difieren de Glahn *et al.* (1990), quienes no encontraron diferencias significativas en la excreción fraccionaria de sodio, además de que señalan una disminución significativa en la excreción del fosfato. Cabe hacer la aclaración de que ellos administraron aflatoxinas a dosis de 2.0 mg /kg PV durante 10 días exclusivamente.

El aumento progresivo de la excreción de sodio podría explicarse por el hecho de que su absorción en el túbulo proximal se realiza por varios mecanismos, como el transporte activo primario, antiporte con  $H^+$  y nutrientes, además de un

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cotransporte con fosfatos (Eaton y Pooler, 2006). Esto podría sugerir que las AF no afectaron a todos los mecanismos de transporte en la semana 17 de tratamiento, ya que la excreción urinaria de sodio no se mostró tan evidente como en las semanas 42 y 67 del período de intoxicación. Por otra parte, se ha reportado un aumento de la excreción fraccional de sodio en relación con la caída de la TFG (Jaramillo-Juárez *et al.*, 1990).

El aumento lineal en la excreción de sodio y fosfatos en el segundo muestreo del período de intoxicación puede ser explicado, al igual que en los mamíferos, por una posible alteración en la función del cotransportador Na /Pi tipo II situado en las células de túbulo proximal de las gallinas (Glahn *et al.*, 1994; Grosman *et al.*, 1983; Huber *et al.*, 2006). El túbulo proximal en mamíferos, reabsorbe aproximadamente el 65 y el 75% del filtrado de sodio y fosfatos, respectivamente (Eaton y Pooler, 2006). Esta alteración podría ser parte de los procesos degenerativos que las AF inducen en las células del túbulo proximal (Asplin y Carnaghan, 1961). Este estudio encontró lesiones microscópicas de las estructuras glomerular y tubular, como los procesos inflamatorios y degenerativos de las estructuras renales, de acuerdo con otros trabajos anteriores (Tung *et al.*, 1973; Mollenhauer *et al.*, 1989; Valdivia *et al.*, 2001).

Como fue explicando anteriormente, los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> están directamente involucrados en el balance de calcio y fosfatos debido a su participación en la reabsorción de ambos elementos en el túbulo proximal; hecho asociado con el aumento de la excreción calcio y fosfatos en la orina y la previamente explicada disminución de estos elementos en plasma.

#### **6.10. PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDO RENAL**

En el presente estudio se observó una disminución en la concentración de proteínas totales en tejido renal en las gallinas intoxicadas con AF, manifestándose de manera significativa en la semana 42 de tratamiento para las concentraciones más altas de AF y para todos los grupos intoxicados en la semana 67.

La disminución de la concentración de proteínas totales en el tejido renal ha sido ampliamente reportada (Stubblefield, 1981; Harvey *et al.*, 1988; Mollenhauer *et al.*, 1989; Hirano *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 1995; Kubena *et al.*, 1997 y 1998; Qureshi *et al.*, 1998; Quezada *et al.*, 2000 y Valdivia *et al.*, 2001), como un efecto tóxico de estas micotoxinas sobre el riñón.

Ha sido reportado como causante de la disminución de proteínas totales en hígado y riñones, (Voigt *et al.*, 1980; Santurio, 2000; Ergun *et al.*, 2006; Denli *et al.*, 2009), que cuando las AF se unen covalentemente con el ADN y ARN, producen la degranulación del retículo endoplásmico rugoso a causa de la disgregación de los polirribosomas, bloqueando la síntesis de ARN; esto trae como consecuencia un mal funcionamiento de los organelos implicados en la síntesis de proteínas.

#### **6.11. CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO**

El GSH constituye una importante molécula antioxidante que es producida por las células del organismo. El GSH contribuye a mantener el poder antioxidante de enzimas como la glutatión peroxidasa, y también de la vitamina C y la vitamina E. Un descenso en la concentración de GSH implicaría una disminución en la capacidad antioxidante de las vitaminas C y E. Los niveles de GSH pueden ser también afectados por factores ambientales, sobre todo por la exposición en forma crónica a sustancias fuertemente oxidantes e incluso a metales pesados.

Se conoce que el hígado es un órgano importante para la síntesis y exportación de GSH, pues aporta más del 90% del glutatión total presente en plasma, el cual, una vez conjugado con un tóxico, es degradado principalmente por el riñón mediante las enzimas GGT, Cisteinil-glicinasa y Transferasa de N-acetilo para formar ácido mercaptúrico y eliminar por vía urinaria los compuestos toxicogénicos (Abbott y Meister, 1986; García y Stipanuk, 1992), por lo que ambos órganos juegan un papel importante en los procesos de detoxificación (Song *et al.*, 2000).

En los resultados que se presentan, las dosis más altas de aflatoxinas (1.0 y 1.5 mg/kg de alimento) provocaron una tendencia a la disminución en la concentración

de glutatión reducido en tejido renal en la semana 42 de intoxicación con referencia al grupo control. Esto pudiera ser explicado como un incremento en el consumo de esta molécula protectora en las actividades de desintoxicación de epóxidos de las AF, mientras que en la semana 67, la recuperación y posterior incremento de la concentración de GSH como efecto de las concentraciones más altas de AF, pudiera deberse a un proceso de maduración de este sistema de fase II a nivel celular o bien a un estímulo positivo del toxico (Quezada *et al.*, 2000, Valdivia *et al.*, 2001). Cabe hacer mención que Dalvi y McGowan (1984) reportan que en su experimento con pollos de engorda de un día de edad, intoxicados con una dieta que contenía 2.5, 5.0 y 10.0 ppm de AFB<sub>1</sub> durante 8 semanas, encontraron que la concentración del Citocromo P<sub>450</sub> disminuyó de manera lineal a la concentración de AFB<sub>1</sub> administrada, por lo cual, supondría que la formación de epóxidos de aflatoxina se ve disminuida, y por lo tanto también disminuiría la utilización de GSH para el metabolismo final de este xenobiótico. El incremento de glutatión reducido en las células renales de las gallinas intoxicadas, se podría explicar, bajo esta situación, como una adaptación del organismo de estas aves a las toxinas administradas.

#### **6.12. ACTIVIDAD DE TRANFERASAS DE GLUTATIÓN**

El grupo de GST son isoenzimas que se encargan de catalizar la conjugación de GSH con numerosas moléculas derivadas de compuestos tóxicos, como las AF (Eaton y Bammler, 1999; Gupta y Srivastava, 2006), considerándose como una importante vía de detoxificación y al mismo tiempo como uno de los factores determinantes en la resistencia a AF entre especies, cuya actividad se ve estimulada por la presencia de concentraciones suficientes de GSH intracelular (Coulombe, 1993 y Manson *et al.*, 1997).

En los resultados que se obtuvieron en tejido renal de las gallinas intoxicadas, se observó un incremento de la actividad de las enzimas GST en todos los grupos que recibieron AF durante el periodo de intoxicación. La actividad específica de esta enzima por mg de proteína, muestra claramente un incremento desde la

semana 17 de intoxicación que toma una regularidad en los muestreos subsecuentes; este efecto se observa aún con el incremento de la concentración de AF. Se puede observar una relación casi lineal con la dosis de las toxinas administradas en los muestreos de las semanas 42 y 67. El incremento gradual por semana de muestreo pudiera ser explicado por la acumulación de epóxidos de AF, o bien por una relación directa con el incremento del glutatión reducido (Quezada *et al.*, 2000, Valdivia *et al.*, 2001).

### **6.13. ACTIVIDAD DE TRANSPEPTIDASA DE GAMA-GLUTAMILO**

Los riñones dentro de las funciones que desempeñan, participan de manera importante en la eliminación de xenobióticos, debido a que tienen la capacidad de metabolizar compuestos tóxicos conferida por la presencia de GSH en sus células y porque poseen actividad enzimática de la GGT (Glossmann y Neville, 1972; Wlodek *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que los pollos intoxicados con AF (0.3 µg /g de PV, 1.2, 3.5 y 5.0 mg/kg de PV) tienen un incremento en la actividad de la GGT en plasma, sugiriendo un daño ocasionado principalmente en hígado (Kubena *et al.*, 1990; Kubena *et al.*, 1993; Okotie-Eboh *et al.*, 1997; Raju *et al.*, 2005). Fernández *et al.* (1994) también detectaron un incremento la actividad de GGT plasmática en gallinas intoxicadas con AF (2.5 y 5.0 mg /kg de PV).

Los incrementos de la actividad de GGT encontrados en los grupos intoxicados en cada una de las semanas de muestreo, al parecer son un efecto de un aumento de los conjugados de los epóxidos de AF con glutatión, que son metabolizados por esta enzima para posteriormente ser transformados en ácido mercaptúrico (N-acetilcisteína). Esta ruta metabólica de la AFB<sub>1</sub>, ha sido ampliamente reportada por diversos autores como la más importante vía de detoxificación de epóxidos de AF en mamíferos y en aves (Eaton *et al.*, 2001; Wild y Turner 2002; Mykkänen *et al.*, 2005 y Johnson *et al.*, 2008).

#### 6.14. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

En el presente estudio, el consumo alimenticio de AF se asoció con la presencia de cambios en la estructura glomerular, tales como las modificaciones del tamaño del espacio de Bowman y engrosamiento de la membrana glomerular. Estos cambios han sido descritos anteriormente (Valdivia *et al.*, 2001; Majid *et al.*, 2007) y el aumento del espacio de Bowman se ha relacionado con una retracción glomerular (Robbins, 2006), lo cual explica la ocurrencia de fallas en el funcionamiento renal, dependiendo de la dosis y duración de la exposición a los xenobióticos (Robbins *et al.*, 2006; Klaassen, 2008). La disminución del espacio de Bowman se puede interpretar como un efecto compensatorio, en el que las nefronas sanas (o menos dañadas) tienden a un estado de hipertrofia y asumen una mayor carga funcional para compensar la pérdida global de la función. En este estudio se observaron evidencias de daño de las estructuras renales pero no se detectó una falla renal letal, lo cual coincide con la suposición de que la TFG de cada una de las nefronas sobrevivientes aumenta por encima de lo normal, realizándose un ajuste hemodinámico intrarrenal (aumento del flujo plasmático glomerular y de la presión hidrostática en el capilar glomerular) que incrementa las fuerzas de ultrafiltración, así como una hipertrofia glomerular que expande la superficie máxima disponible para el filtrado incrementando la capacidad de reserva funcional de los riñones ante el desafío tóxico por las AF (Klaassen, 2008).

El engrosamiento de la membrana basal del glomérulo encontrado en este estudio, ha sido relacionado (Mollenhauer *et al.*, 1989; Robbins, 2006) principalmente con una glomerulonefritis membranosa, que se caracteriza por la presencia de depósitos subepiteliales que contienen inmunoglobulinas a lo largo de la membrana basal. Los depósitos subendoteliales que se adhieren a la membrana basal glomerular son los que parecen producir el engrosamiento característico y la pérdida de las proyecciones de los podocitos.

Por otro lado, en este estudio se encontró amiloidosis en el 41.0% de los cortes evaluados procedentes de gallinas que consumieron el tóxico, mientras que sólo

se apreció en uno de los animales que consumieron el alimento libre de las micotoxinas. Por lo anterior se puede relacionar la presencia de la amiloidosis con el consumo prolongado de AF. La amiloidosis ha sido asociada (Robbins, 2006) con la acumulación de proteínas fibrilares patogénicas en los riñones y otros órganos, reunidas en una conformación terciaria insoluble, por exceso de síntesis o por resistencia al catabolismo. A medida que el material se acumula, produce atrofia por presión del parénquima adyacente. La amiloidosis dar lugar a alteraciones potencialmente mortales. Se asocia en un 40% a las glomerulonefritis (GN) crónicas, donde la sustancia amiloide se deposita en los glomérulos y en las paredes vasculares produciendo proteinuria intensa, y finalmente desarrolla una nefropatía terminal. Los riñones suelen ser de tamaño normal o estar algo agrandados (Robbins, 2006). La amiloidosis también se ha indicado que se produce como una respuesta secundaria a una enfermedad crónica o procesos destructivos de tejido (Maxie, 2007).

La deposición de material amiloide en la membrana basal glomerular y tubular en la mayoría de los casos es parte de una amiloidosis generalizada, que causa graves daños glomerulares en el síndrome nefrótico, y posiblemente la gota. A menudo continúa a la inflamación crónica, A pesar de tener buen apetito, las aves pierden peso y parecen letárgicas. Los signos clínicos pueden incluir ascitis o edema de las extremidades (Lierz, 2003).

En el presente estudio, también se apreció infiltración linfocitaria caracterizada por la presencia de células inflamatorias en áreas de tejido renal dañado, asociada significativamente ( $X^2 < 0.05$ ) al consumo de AF. Esta infiltración linfocitaria se ha asociado (Kelley y Mora, 1976; Klaassen, 2008) a una respuesta inflamatoria en la que participan linfocitos, mononucleares y polimorfonucleares, que puede estar involucrada en un proceso regenerativo de células parenquimatosas y no parenquimatosas.

Se ha indicado que la degeneración epitelial y la falta del borde en cepillo en los túbulos contorneados proximales son signos de necrosis tubular aguda

ocasionados por este tipo de micotoxinas (Majid *et al.*, 2007). Esta lesión fue observada en el presente estudio y muestran el grado de daño diferencial de las estructuras renales ante el consumo prolongado de AF por las gallinas de postura.



## 7. CONCLUSIONES

La ingestión de alimento contaminado con AF durante un ciclo de postura (67 semanas) afectó de manera significativa la función renal de las gallinas expuestas a sus efectos nocivos. Los parámetros de la función renal presentaron alteraciones evidentes desde la semana 17 del período de intoxicación, especialmente en la tasa de filtración glomerular y excreción fraccional de calcio, sodio y fosfatos.

Las aflatoxinas también indujeron lesiones histológicas en las estructuras renales, principalmente degeneración celular de los túbulos proximales, engrosamiento de la membrana basal glomerular y glomerulonefritis. Sin embargo, la estructura y el daño funcional del riñón producido por la ingestión de AF en concentración de 0.5, 1.0 y 1.5 mg /kg de alimento, no fue suficiente para inducir una insuficiencia renal aguda ni crónica, ni tampoco la muerte de las gallinas. Por lo que se puede suponer que las aflatoxinas modificaron la función renal debido a las lesiones causadas en las estructuras renales así como por la alteración del transporte de iones en las células dañadas renales.

Los mecanismos renales de biotransformación de xenobioticos, (concentración de GSH y las actividades específicas de GST y GGT) mostraron una respuesta metabólica defensiva de acuerdo a las concentraciones de AF administradas en el presente estudio, de tal manera que, aunque hubo lesiones histológicas evidentes, los riñones pudieron mantener su funcionalidad.

De manera particular, los efectos de las aflatoxinas y el tiempo de exposición a ellas sobre el funcionamiento renal de las gallinas intoxicadas fueron los siguientes:

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- La concentración de aflatoxinas en la dieta y el tiempo de ingestión de la micotoxina, indujo un decremento en el peso corporal de las gallinas intoxicadas.
  - La interacción de la concentración de aflatoxinas en el alimento y el tiempo de exposición al tóxico, produjo un incremento del peso relativo de los riñones a las 67 semanas de intoxicación.
  - El consumo de aflatoxinas en las concentraciones utilizadas, ni el tiempo de exposición a las mismas, bajo las condiciones experimentales de este estudio, modificaron la presión sanguínea arterial y el flujo plasmático renal.
  - La interacción de la concentración de aflatoxinas con el tiempo de ingestión del tóxico disminuyó significativamente la tasa de filtración glomerular de las gallinas intoxicadas, desde la semana 17 de intoxicación.
  - El consumo de aflatoxinas, bajo este esquema de intoxicación, no modificó la excreción fraccional de potasio.
  - La interacción de la concentración de aflatoxinas con el tiempo de ingestión de las mismas, incrementaron significativamente las excreciones fraccionales de sodio, calcio y fosfato.
  - La interacción de la concentración de aflatoxinas con el tiempo de ingestión de las toxinas, produjo una disminución significativa de las proteínas del tejido renal.
  - Las dosis de 1.0 y 1.5 mg de aflatoxinas /kg de alimento, produjeron una disminución significativa del glutatión reducido.
  - La interacción de la concentración de aflatoxinas con el tiempo de ingestión de las toxinas produjeron un incremento significativo de la actividad de las enzimas transferasas de glutatión.

- La interacción de la concentración de aflatoxinas con el tiempo de ingestión de las toxinas Incremento significativo de la actividad de la enzima transpeptidasa de  $\gamma$ -glutamilo.
- Las aflatoxinas indujeron lesiones en la estructura microscópica del tejido renal, como son: pérdida de arreglo estructural, mayor espacio entre estructuras renales, aumento del espacio de Bowman, amiloidosis localizada, infiltración linfocitaria, desprendimiento celular del borde en cepillo, degeneración celular y vacuolización intracelular.



## 8. GLOSARIO

ADN. Ácido desoxirribonucleico. Molécula compleja, integrante de los cromosomas, que almacena la información hereditaria en forma de variaciones (con características de código) en la secuencia de las bases de purina y pirimidina; esta información se traduce en la síntesis de las proteínas, por lo que es determinante en todas las características físicas y funcionales de las células y del organismo.

AFs. Aflatoxinas. Toxinas producidas por hongos, por ejemplo *Aspergillus flavus*. Causan envenenamiento en animales que consumen alimentos contaminados.

ALT. Alanina aminotransferasa. Enzima involucrada en la transferencia de aminoácidos. Es usada para medir daño hepático, principalmente.

APG. Ácido pteroilglutámico. Vitamina necesaria como cofactor de enzimas que construyen moléculas a partir de compuestos con un sólo átomo de carbono (metanol, formaldehído, etc).

ARN. Ácido ribonucleico. Polímero constituido por 4 nucleótidos fundamental en los procesos de síntesis de proteínas.

AST. Aspartato aminotransferasa. Enzima presente normalmente en el suero y en ciertos tejidos corporales, que actúa sobre la transferencia intermolecular de un grupo amino desde el ácido aspártico al ácido alfa-cetoglutarico, para formar ácido glutámico y ácido oxaloacético

ATP. Adenosin trifosfato. Nucleótido compuesto de adenina, ribosa y tres grupos fosfato, fundamental para la obtención de energía química en las células. Los grupos fosfato terminales son altamente reactivos en el sentido de que su hidrólisis o transferencia a otra molécula, se lleva a cabo con la liberación de una gran cantidad de energía libre.

cm. Centímetro. Centésima parte de un metro.

- Cl. Cloro. Metaloide gaseoso de color verde amarillento, olor fuerte y sofocante y sabor cáustico.
- DL50. Dosis letal media. Dosis, calculada estadísticamente, de un agente químico o físico (radiación) que se espera que mate a 50% de los organismos de una población bajo conjunto de condiciones definidas.
- DIn. Depuración de Inulina
- DPA. Depuración de ácido p-amino-hipúrico
- EE. Error estándar
- EF. Excreción fraccional. Es el porcentaje de una sustancia filtrada que es excretada en la orina.
- EFF. Excreción fraccional de fósforo
- EFS. Excreción fraccional de sodio
- EFSkg. Excreción fraccional de sodio por kilogramo de peso corporal
- et al. Y colaboradores
- FAO. Organización Americana para la Alimentación
- Fc. Parámetro F calculado en el análisis de varianza
- FF. Fracción de filtración
- FPR. Flujo plasmático renal
- FPRkg. Flujo plasmático renal por kilogramo de peso corporal
- FSR. Flujo sanguíneo renal
- g. Gramo. Milésima parte de un kilogramo.
- H. Hora. Unidad de tiempo que se corresponde con la veinticuatroava parte de un día solar medio.
- HA. Hipótesis alternativa
- Hg. Mercurio
- K. Potasio. Es un metal alcalino, blanco-plateado que abunda en la naturaleza, en los elementos relacionados con el agua salada y otros minerales. Se oxida rápidamente en el aire, es muy reactivo, especialmente en agua, y se parece químicamente al sodio. Es un elemento químico esencial.
- H. Hidrógeno. Elemento detectable más común del universo y el mas liviano, con un núcleo que incluye un protón.

IARC. Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cancer

In. Inulina

IgM. Inmunoglobulina M. Es la clase de inmunoglobulina caracterizada por cadenas pesadas  $\mu$ . Es la primer inmunoglobulina en aparecer en la superficie de células B y la primera que se segrega.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática

Kg. Kilogramo. Unidad de masa del Sistema Internacional, aproximadamente igual a la masa de 1000 centímetros cúbicos de agua a la temperatura de su máxima densidad, cuatro grados centígrados.

L. Litro. Unidad de capacidad del Sistema Métrico Decimal que equivale al volumen de un decímetro cúbico.

$\mu$ m. Micras o micrómetros. Medida de longitud que equivale a la millonésima ( $10^{-6}$ ) parte del metro.

mg. Miligramo. Milésima parte de un gramo.

mg/dL. Miligramos por decilitro

mg/kg. Miligramos por kilogramo de peso corporal

mg/kg/día. Miligramos por kilogramo de peso corporal por día

mg/kg/h. Miligramos por kilogramo de peso corporal por hora

mg/kg/min. Miligramos por kilogramo de peso corporal por minuto

mg/mL. Miligramos por mililitro

mL. Mililitros. Milésima parte de un litro, o sea un centímetro cúbico.

mL/min. Mililitros por minuto

mL/min/kg. Mililitros por minuto por kilogramo de peso corporal

mL/kg/min. Mililitros por kilogramo de peso corporal por minuto

mARN. Ácido ribonucleico mensajero. Molde para la síntesis de proteínas; la secuencia de bases del mARN es complementaria a la de un gen en el ADN.

min. Minuto. Unidad de tiempo que equivale a la sexagésima parte de una hora.

mm. Milímetro. Milésima parte de un metro.

MOs/L. Miliosmoles por litro

ng. Nanogramo. Milmillonésima parte del gramo.

Na. Sodio. Es un metal alcalino blando, untuoso, de color plateado, muy abundante en la naturaleza, encontrándose en la sal marina y el mineral halita. Es muy reactivo, arde con llama amarilla, se oxida en presencia de oxígeno y reacciona violentamente con el agua.

NADPH. Nicotin adenin dinucleótido reducido

NRC. Consejo Nacional de Investigación de Estados Unidos de América

P. Probabilidad de "F" en el análisis de varianza

PAH. Ácido p-aminohipúrico

P.C. Peso corporal.

PAM. Presión arterial media

Pc. Presión del líquido capsular

PCS. Peso corporal semanal

Pfe. Presión de filtración efectiva

pH. Potencial de hidrógeno. La variación en el potencial de hidrógeno determina la acidez o alcalinidad de una sustancia.

Phs. Presión hidrostática sanguínea

Po. Presión oncótica. suma de la presión osmótica debida a las proteínas del plasma y de la presión osmótica derivada del equilibrio de Gibbs-Donnan, ocasionado por el gradiente eléctrico que se origina cuando existen proteínas cargadas a un lado de una membrana semi-permeable.

ppm. Partes por millón. El número de unidades de una sustancia en un millón de unidades. Partes por millón es una unidad de la concentración común para diluir muestras de sustancias disueltas o de las sustancias aerotransportadas.

Px. Concentración de la sustancia (x) en el plasma

SAGARPA. Secretaría de Agricultura Ganadería, Recursos Pesqueros y Alimentación.

Sca. Pollos controles que recibieron sulfacetamida sódica

ScaAFB1. Pollos intoxicados con AFB1 que recibieron sulfacetamida sódica

Sna. Pollos controles que recibieron sulfanilamida

SnaAFB1. Pollos intoxicados con AFB1 que recibieron sulfanilamida

TFG. Tasa de filtración glomerular. Es el volumen de fluido filtrado por unidad de tiempo desde los capilares glomerulares renales hacia el interior de la cápsula de Bowman.

TFGkg. Tasa de filtración glomerular por kilogramo de peso corporal

TM. Tipo mamífero

TR. Tipo reptil

UxV. Concentración de la sustancia (x) en orina



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M. L., M. Bragulat, G. Castella y F. J. Cabanes. 1994. Mycoflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. *Journal of Food Protection*. 57: 256-258.
- Abbott, W. A. y A. Meister. 1986. Intrahepatic transport and utilization of biliary glutathione and its metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 83: 1246–1250.
- Abo-Norag, M. T. S. Edrington, L. F. Kubena, R. B. Harvey y T. D. Phillips. 1995. Influence of a hydrated sodium calcium aluminosilicate and virginiamycin on aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*. 74: 626–632.
- Agag, B. I. 2004. Mycotoxins in foods and feeds, 1-aflatoxins. *Bulletin Environmental Research*. 7: 173-205.
- Allameh, A., A. Safamehr, S. A. Mirhadi, M. Shivazad, M. Razzaghi-Abyaneh y A. Afshar-Naderi. 2005. Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains. *Animal Feed Science and Technology*. 122: 289-301.
- Ames, E., K. Steven y E. Skadhauge. 1971. Effects of arginine vasotocin on renal excretion of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , and urea in the hydrated chicken. *American Journal of Physiology*. 221: 1223.
- Aravind, K. L., V. S. Patil, G. Devegowda, B. Umakantha y S. P. Ganpule. 2003. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science*. 82: 571-576.

- Arrieta, D., M. L. Pérez-Arévalo, C. Gómez, E. Ascanio, B. Irausquin y G. Molero. 2006a. Efecto del consumo del cultivo de levadura *Saccharomyces cerevisiae*1026 y/o Selenio en pollos de engorde expuestos a bajas concentraciones de aflatoxina B<sub>1</sub> en la dieta. 1. Valores de proteínas séricas y actividad enzimática en suero. Revista Científica-Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ. 16: 613-621.
- Arrieta, D., M. L. Pérez-Arévalo, C. Gómez, G. Molero, E. Novoa, H. Rincón y E. Ascanio. 2006b. Efecto del alimento contaminado con aflatoxina B<sub>1</sub> (0.07 mg/kg) sobre la morfología hepática y actividad enzimática sérica (AST y ALT) en pollos de engorde. Revista Científica-Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ. 16: 39-47.
- Asplin, F. D. y R. B. A. Carnagham. 1961. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. Veterinary Records. 3: 1215-1218.
- Bailey, C. A., G. W. Latimer, A. C. Barr, W. L. Wigle, A. U. Haq, J. E. Balthrop, and L. F. Kubena. 2006. Efficacy of montmorillonite clay (NovaSil PLUS) for protecting full-term broilers from aflatoxicosis. Journal of Applied Poultry Research. 15: 198–206.
- Bailey, R. H., L. F. Kubena, R. B. Harvey, S. A. Buckley y G. E. Rottinghaus. 1998. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. Poultry Science. 77: 1623–1630.
- Bannai, S. y N. Tateishi. 1986. Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. Journal of Membrane Biology. 89: 1
- Beleta, J. y F. J. Gella. 1990. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la gamma glutamiltransferasa en suero sanguíneo humano. Química Clínica. 9: 58–61.

- Bennett, J. W. y M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiological Review*. 16: 497-516.
- Berger, L., T. F. Yu y T. F. Gutman. 1960. Effects of drugs that alter uric acid excretion in man on uric acid clearance in the chicken. *American Journal of Physiology*. 198: 575.
- Bilgrami, K. S. y K. K. Sinha. 1986. Aflatoxin in India: En: M. S. Zuber, E. B. Lillehoj y B. L. Renfro (Eds.). *Aflatoxin in maize. A proceedings of the workshop*. El Batán. México. D. F. CIMMYT.
- Bintvihok, A., S. Thiengnin, K. Doi y S. Kumagai. 2002. Residues of aflatoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *Journal Veterinary Medical Science*. 64: 1037-1039.
- Bogantes, P., D. Bogantes y S. Bogantes. 2004. Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*. 46: 174-178.
- Borsa, A., A. Kohayagawa, L. P. Boretti, M. E. Saito y K. Kuibida. 2006. Serum levels of hepatic enzyme function in clinically healthy broiler chickens. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58: 675-677.
- Bowman, W. C. y M. J. Rand. 1985. *Farmacología: bases bioquímicas y patológicas -aplicaciones clínicas*. 2ª. Ed. Interamericana. México.
- Braun, E. J. 1982. Renal function. *Comparative Biochemical Physiology*. 70: 511.
- Busby, W. F. y Wogan G. N. 1984. *Aflatoxins Chemical Carcinogens*. (Chapter 16). Seattle C. E. Washington D. C. American Chemical Society. 2: 946-1135.
- CAST. 2003. *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems*. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa. USA.
- Celik, S., Z. Erdogan, S. Erdogan y R. Bal. 2005. Efficacy of tribasic copper chloride (TBCC) to reduce the harmful of aflatoxin in broilers. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 29: 909-916.

- Cole, R. J. y R. H. Cox. 1981. Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press. New York.
- Cortez, M. O., M. L. Aldana, A. G. Valdivia, T. Quezada y R. Martínez. 2009. Contaminación natural y accidental de los alimentos. En: Jaramillo-Juárez, F. A. R. Rincón y R. Rico-Martínez. Toxicología ambiental. Colección Textos Universitarios, UAA-UdeG, Aguascalientes, México.
- Coulombe, R. A., J. A. Guarisco, P. J. Klein y J. O. Hall. 2005. Chemoprevention of aflatoxicosis in poultry by dietary butylated hydroxytoluene. *Animal Feed Science and Technology*. 121: 217-225.
- Coulombe, R. A. (1993) Symposium: Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*. 76: 880-891.
- Dale, N. M., R. D. Wyatt y H. L. Fuller. 1980. Additive toxicity of aflatoxin and dietary tannins in broiler chicks. *Poultry Science*. 59: 2417-2420.
- Dalvi, R. R. y C. McGowan. 1984. Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chickens by purified aflatoxin B<sub>1</sub> and its reversal by activated charcoal, Phenobarbital, and reduced glutathione. *Poultry Science*. 63: 485-491.
- Dantzler, W. H. 1966. Renal response of chickens to infusion of hyperosmotic sodium chloride solution. *American Journal of Physiology*. 210: 640.
- Dantzler, W. H. y E. J. Braun. 1980. Comparative nephron function in reptiles, birds, and mammals. *American Journal of Physiology*. 8: 197.
- De Luna, L. M. C. 2010. Efecto protector de *Saccharomyces cerevisiae*, Etoxiquina y N-Acetilcisteína contra la intoxicación alimentaria crónica por aflatoxinas en gallinas de postura. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.

- Del Río, J. C., E. Ávila, M. T. Casaubon, R. Rosiles, N. Ledesma, V. M. Petrone y E. Moreno. 2006. Efecto del 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D3) en presencia de aflatoxina B<sub>1</sub>, sobre el comportamiento productivo en el pollo de engorda. *Revista Electrónica de Veterinaria. REDVET.* 7.
- Denli, M., J. C. Blandon, M. E. Guynot, S. Salado y J. F. Pérez. 2009. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B<sub>1</sub>. *Poultry Science.* 88: 1444–1451.
- Diaz, G. J., E. Calabrese y R. Blain. 2008. Aflatoxicosis in Chickens (*Gallus gallus*): An Example of Hormesis?. *Poultry Science.* 87: 727–732.
- Dixon, J. M. 1958. Investigation of urinary water resorption in the cloaca and rectum of hen. *Poultry Science.* 37; 410.
- Dolleary, F. G. 1969. Aflatoxin scientific background, control and implications, Ed. Leo Goldblatt. Academic Press. Nueva York.
- Duarte-Vogel, S. y L. C. Villamil-Jiménez. 2006. Micotoxinas en la Salud Pública. *Revista Salud Pública.* 8: 129-135.
- Eaton, D. C. y J. P. Pooler. 2006. Fisiología renal de Vander. Mc. Graw-Hill Interamericana. México, D.F. pp. 214.
- Eaton, D. L., T. K. Bammler y E. J. Kelly. 2001. Interindividual differences in response to chemoprotection against aflatoxin-induced hepatocarcinogenesis: implications for human biotransformation enzyme polymorphisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 500: 559-576.
- Eaton, D. L. y T. K. Bammler. 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicology Science.* 49: 156-164.

- Edrington, T. S., L. F. Kubena, R. B. Harvey y G. E. Rottinghaus. 1997. Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. *Poultry Science*. 76: 1205-1211.
- Eckert, R., D. Randall y G. Agustine. 1990. *Fisiología animal, mecanismos y adaptaciones*. Interamericana-Hill. México.
- Egner, P. A., X. Yu, J. K. Johnson, C. K. Nathasingh, J. D. Groopman, T. W. Kensler y B. D. Roebuck. 2003. Identification of aflatoxin M<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanine in liver and urine of tree shrews and rats following administration of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Chemical Research Toxicology*. 16: 1174-1180.
- Ergun, E., L. Ergun y D. Essiz. 2006. Light and electron microscopic studies on liver histology in chicks fed aflatoxin. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 113: 363-368.
- Essigmann, J. M., R. G. Croy, R. A. Bennett y G. N. Wogan. 1982. Metabolic activation of aflatoxin B<sub>1</sub>: patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews*. 13: 581-602.
- Essiz, D., L. Altintas y Y. K. Das. 2006. Effects of aflatoxin and various adsorbents on plasma malondialdehyde levels in quails. *Bulletin Veterinary Institute Pulawy*. 50: 585-588.
- FAO. 1980. *On-Farm Maize Drying and Storage in the Humid Tropics*. FAO Agricultural Service Bulletin, No. 40. Rome.
- FAO. 1993. Sampling plans for aflatoxins in peanuts and corn. *FAO Food Nutrition*. 55: 1-77.
- FAO. 2003. *Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos en la prevención y control de las micotoxinas*. FAO Alimentación y Nutrición. 73: 6-15.

- FASS. 1999. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. Federation of Animal Science Societies, Champaign, IL.
- Fernández, A., M. T. Verde, J. Gómez, M. Gascón y J. J. Ramos. 1995. Changes in the prothrombin time, haematology and serum protein during experimental aflatoxicosis in hens and broiler chickens. *Research of Veterinary Sciences*. 58:119-122.
- Fernandez, A., M. T. Verde, M. Gascon, J. Ramos, J. Gomez, D. F. Luco y G. Chavez, (1994) Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin-containing feed. *Avian Pathology*. 23: 37-47.
- Flores, C.M., L.B. Hernández y J. Vázquez. 2006. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Técnica Pecuaria México*. 44: 247-256.
- Forrester, L. M., G. E. Neal, D. J. Judah, M. J. Glancey y C. R. Wolf. 1990. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism in human liver. *Proceeding National Academy Science*. USA. 87: 8306-8310.
- Fraga, M.E., F. Curvello, M.J. Gatti, L.R. Cavaglieri, A.M. Dalcero y C.A. da Rocha Sosa. 2007. Potencial aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. *Veterinaty Research Community*. 31: 343-353.
- Freeman, B. M. 1983. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. Academic Press. London.
- García, R. A. C. y M. H. Stipanuk. 1992. The splanchnic organs, liver and kidney have unique roles in the metabolism of sulfur amino acids and their metabolites in rats. *Journal of Nutrition*. 122: 1693–1701.

- Gawai, K. R., J. K. Vodela, P. S. Dalvi y R. R. Dalvi. 1992. Comparative assessment of the effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on hepatic dysfunction in some mammalian and avian species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 101: 415–418.
- Getty, R. 1998. S. Sisson y J. D. Grossman. *Anatomía de los animales domésticos*. Tomo II. 5ª Ed. Reimp. Ed. Masson. Barcelona, España.
- Glahn, R. P., K. W. Beers, W. G. Bottje, R. F. Jr. Wideman y W. E Huff. 1990. Altered renal function in broilers during aflatoxicosis. *Poultry Science*. 69: 1796-1799.
- Glahn, R. P., K. W. Beers, W. G. Bottje, R. F. Wideman Jr, W. E. Huff y W. Thomas. 1991. Aflatoxin altered avian renal function, calcium, and vitamin D metabolism. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 3: 309-321.
- Glossmann, H. y D. M. Neville. 1972. □-Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Letters*. 19: 340–344.
- Goldman, R. y P. G. Shields. 2003. Food mutagens. *Journal of Nutrition*. 3: 965-973.
- Gornall, A. G, C. S. Bardawill y M. M. David. 1949. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 177: 751–766.
- Gowda, N. K. S., D. R. Ledoux, G. E. Rottinghaus, A. J. Bermudez y Y. C. Chen. 2008. Efficacy of tumeric (*Curcuma longa*), containing a know level of curcumin, and a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the adverse effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*. 87: 1125–1130.
- Graham, J. 1982. The occurrence of aflatoxin in peanuts in relation to soil type and pod splitting. *Food Technology Association of Australia*. 34: 208-212.

- Gupta, S. y A. K. Srivastava. 2006. Glutathione metabolism of filarial worms: a vulnerable target for the design and synthesis of new antifilarial agents. *Medical Science Monitor*. 12: HY1–9.
- Guengerich, F. P., H. Cai, M. McMahon, J. D. Hayes, T. R. Sutter, J. D. Groopman, Z. Deng y T. M. Harris. 2001. Reduction of aflatoxin B<sub>1</sub> dialdehyde by rat and human aldo-keto reductases. *Chemical Reserach Toxicology*. 14: 727–737.
- Guengerich, F.P., K.O. Arneson, K.M. Williams, Z. Deng y T.M. Harris. 2002. Reaction of aflatoxin B<sub>1</sub> oxidation products with lysine. *Chemical Research Toxicology*. 15: 780-792.
- Gylstorff, I. y F. Grimm. 1998. *Vogelkrankheiten*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Habig, W. H., J. Pabst y W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry*. 249: 7130–7139.
- Hayes, J. R, C. E. Polan y T. C. Campbell. 1977. Bovine liver metabolism and tissue distribution of aflatoxina B<sub>1</sub>. *Journal Agriculture Food Chemical*. 25: 1189-1193.
- Henderson, C. J., A. Sahraoui y C. R. Wolf. 2000. Cytochrome P450s and chemoprevention. *Biochemical Society Transactions*. 28: 42-46.
- Hirano, K., Y. Adachi y S. Ishibashi. 1994. Possible role of bovine serum albumin for the prevention of aflatoxin B<sub>1</sub> absorption from the intestinal tract in young chicks. *Journal of Veterinary Medical Science*. 56: 281-430.
- Hissin P. J. y R. Hilf. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*. 74: 214–226.
- Holmes, W. N., G. L. Fletcher y D. J. Steward. 1968. The patterns of renal electrolyte excretion in ducks, maintained on freshwater and on hypertonic saline. *Journal of Experimental Biology*. 48: 487.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Hsieh, D. y J. J. Wong. 1994. Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxins. The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. Eaton D. L. and Groopman J. New York. Academic Press.
- Huff, W. E., L. F. Kubena, R. B. Harvey, D. E. Corrier, y H. H. Mollenhauer. 1986. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. Poultry Science. 65: 1891-1899.
- Huff, W. E., R. B. Harvey y L. F. Kubena. 1988. Toxic synergism between aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. Poultry Science. 67: 1418-1423.
- Hy-Line International. 2007. Hy-Line Variety W-36 Commercial Management Guide 2007–2008. Hy-Line International, West Des Moines, IA.
- IARC. 1993. Aflatoxins. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer. Summaries & Evaluations. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. 56: 245-395.
- IARC. 2002. Aflatoxins (Group I). International Agency for Research on Cancer. Summaries & Evaluations. 82: 171.
- IFCC. 1983. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for gamma glutamyltransferase. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. 21: 633–646.
- INEGI. 2005. Perspectiva Estadística Aguascalientes. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Edición 2005.
- Jand, S. K., P. Kaur y N. S. Sharma. 2005. Mycoses and mycotoxicosis in poultry: a review. Indian Journal of Animal Sciences. 75: 465-476.
- Jansen van Rensburg, C., C. E. J. Van Rensburg, J. B. Van Ryssen, N. H. Casey y G. E. Rottinghaus. 2006. In vitro and in vivo assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. Poultry Science. 85: 1576-1583.

- Jaramillo-Juárez, F., M. Mello-Aires, y G. Malnic. 1990. Urinary and proximal tubule acidification during reduction of renal blood flow in the rat. *Journal of Physiology*. 421: 475-483.
- Jewers, K. 1987. Problems in relation to sampling of consignments for mycotoxin determination and interpretation of results. A paper presented on the Joint FAO/WHO/UNEP Second International Conference on Mycotoxins. Bangkok, Thailand.
- Johnson, D. N., P. Egner, G. O'Brien, N. Glassbrook, B. D. Roebuck, T. R. Sutter, G. A. Payne, T. W. Kensler y J. D. Groopman. 2008. Quantification of Urinary Aflatoxin B<sub>1</sub> Dialdehyde Metabolites Formed by Aflatoxin Aldehyde Reductase Using Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research Toxicology*. 21: 752–760
- Johnson, W. W. y F. P. Guengerich. 1997. Reaction of aflatoxin B<sub>1</sub> exo-8,9-epoxide with DNA: kinetic analysis of covalent binding and DNA-induced hydrolysis. *Proceedings National Academy Science*. 94: 6121-6125.
- Kamdem, L. K., I. Meineke, U. Godtel-Armbrust, J. Brockmoller y L. Wojnowski. 2006. Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Chemical Research Toxicology*. 19: 577-586.
- Karasawa, Y. y A. Sakae. 1981. Comparative effect of intravenously administered purine compounds on uric acid production in chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 70: 591.
- Kelley, V. C. y E. C. Mora. 1976. Ultrastructural changes induced by chronic aflatoxicosis in chickens. *Poultry Science*. 55: 317–324.
- Kemal, Ç., Denlýll, M. y S. Türker. 2003. Reduction of toxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicks diets. *Revista Brasileira de Zootecnia*. On-line version ISSN 1806-9290. 32 (3)

- Kidd, P. M. 1997. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Review*. 2: 155–176.
- Kim, J. G., Y. W. Lee, P. G. Kim, W. S. Roh y H. Shintani. 2003. Reduction of aflatoxins by Korean soybean paste and its effect on cytotoxicity and reproductive toxicity-Part 3. Inhibitory effects of Korean soybean paste (doen-jang) on aflatoxin toxicity in laying hens and aflatoxin accumulation in their eggs. *Journal Food Protection*. 66: 866-873.
- Kiran, M. M., O. Demet, M. Ortatatlı y H. Oguz. 1998. The preventive effect of polyvinylpolypyrrolidone on aflatoxicosis in broilers. *Avian Pathology*. 27: 250–255.
- Klaassen, C. D. 2008. Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 7ª edición. Editorial McGraw – Hill. Kansas City, USA.
- Klein, P. J., T. R. Van Vleet, J. O. Hall y R. A. Jr. Coulombe. 2003. Effects of dietary butylated hydroxytoluene on aflatoxin B<sub>1</sub>-relevant metabolic enzymes in turkeys. *Food Chemical Toxicology*. 41: 671-678.
- Kubena, L. F., R. B. Harvey, S. A. Buckley, T. S. Edrington y G. E. Rottinghaus. 1997. Individual and combined effects of moniliformin present in *Fusarium fujikuroi* culture material and aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*. 76: 265-270.
- Kubena, L. F., R. B. Harvey, R. H. Bailey, S. A. Buckley y G. E. Rottinghaus. 1998. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind™) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science*. 77: 1502–1509.
- Kubena, L. F., R. B. Harvey, S. A. Buckley, T. S. Edrington y G. E. Rottinghaus. 1997. Individual and combined effects of moniliformin present in *Fusarium fujikuroi* culture material and aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*. 76: 265–270.

- Kubena, L. F., R. B. Harvey, W. E. Huff, M. H. Elissalde, A. G. Yersin, T. D. Phillips y G. E. Rottinghaus. 1993. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. *Poultry Science*. 72: 51–59.
- Kubena, L. F., R. B. Harvey, W. E. Huff, D. E. Corrier, T. D. Phillips y G. E. Rottinghaus. 1990. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poultry Science*. 69: 1078–1086.
- Kumagai, S. 1989. Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 97: 88-97.
- Ledoux, D. R., G. E. Rottinghaus, A. J. Bermudez y M. Alonso-Debolt. 1999. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*. 78: 204-210.
- Lierz, M. 2003. Avian renal disease: pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Veterinary Clinics Exotic Animal*. 6: 29–55
- Lin, J. K., J. A. Miller y E. C. Miller. 1977. 2,3-Dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B<sub>1</sub>, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA or -ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome-mediated reactions and in rat liver in vivo. *Cancer Research*. 37: 4430-4438.
- Lumeij J. T. 1994. Nephrology. In: Ritchie B. W. , G. J. Harrison, L. R. Harrison editors. *Avian medicine. Principles and application*. Lake Worth: Wingers Publishing; 1994. p. 538–555
- Majid, M. F., A. Abood y H. Hammadi. 2007. Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced kidney damage in rats. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*. 49: 147–150.
- Manson, M. M., H. W. Ball, M. C. Barrett, H. L. Clark, D. J. Judah, G. Williamson y G. E. Neal. 1997. Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phase I and II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism. *Carcinogenesis*. 18: 1729–1738.

- Martínez, A. A. 2003. Efecto de la Aflatoxina B<sub>1</sub> sobre la Función Renal en pollos de engorda. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.
- Martínez, M., D. Barrado, M. Zubillaga, A. Hager, T. De Paoli y J. Boccio. 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 40: 45–51.
- Martínez, A., F. Jaramillo-Juárez, T. Quezada, R. Ortiz, F. J. Damián, J. Llamas, M. L. Rodríguez y A. G. Valdivia. 2006. Methodology to evaluate the renal function in broiler chickens. *Scientiae Naturae*. 8: 1: 5-14.
- Maxie, M. G. 2007. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestics animals. Volumen 2. 5ª edición. Elsevier Saunders Co. USA.
- Meister, A. y S. S. Tate. 1976. Glutathione and related g-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annual Review of Biochemistry*. 45: 559.
- Mela, M. E., M. L. Hamm, P. T. Henderson, C. M. Harris, T. M. Harris y J. M. Essigmann. 2002. The aflatoxin B<sub>1</sub> formamiopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocelular carcinoma. *Proceeding of National Academy of Science (PNA)*. 99: 6655-6660.
- Miazzo, R. M., F. Peralta, C. Magnoli, M. Salvano, S. Ferrero, S. M. Chiacchiera, E. C. Carvalho, C. A. Rosa y A. Dalcerro. 2005. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poultry Science*. 84: 1–8.
- Mollenhauer, H. H., D. E. Corrier, W. E. Huff, L. F. Kubena, R. B. Harvey y R. E. Droleskey. 1989. Ultrastructure of hepatic and renal lesions in chickens fed aflatoxin. *American Journal of Veterinary Research*. 50: 771-777.

- Morales, S. E., L. I. Montesinos, L. E. García, A. C. Núñez y L. A. Camacho. 2008. Glomerulocystic kidney disease in two dogs with renal failure. *Veterinaria México*. Vol. 39 n.1. Versión impresa ISSN 0301-5092.
- Morbini, J., F. Rutz, C. A. Mallmann y G. S. Pinto. 2006. Utilization of sodium bentonita as adsorbent of aflatoxins in broiler feed. *Ciencia Rural*. 36: 1594-1599.
- Moreno, M. E. 1989. Hongos y micotoxinas en granos almacenados. Curso de actualización sobre micotoxicosis aviar. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México. Mexico D. F.
- Morigachi, R., H. Izawa y M. Soekowa. 1974. Histopathology and spontaneous amyloidosis in duck. *Kitasato Archive Experimental Medicine*.47:211-226.
- Mykkanen H., H. Zhu, E. Salminen, R. O. Juvonen, W. Ling, J. Ma., N. Polychronaki., H. Kemilainen, O. Mykkanen, S. Salminen y H. El-Nezami. 2005. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B<sub>1</sub> metabolites (AFQ<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub> and AFB-N<sup>7</sup>-guanine) in young Chinese males. *International Journal Cancer*. 115: 879-884.
- Neal, G. E., U. Nielsch, D. J. Judah y P. B. Hulbert. 1987. Conjugation of model substrates or microsomally activated aflatoxin B<sub>1</sub> with reduced glutathione, catalysed by cytosolic glutathione-Stransferases in livers of rats, mice and guinea pigs. *Biochemical Pharmacology*. 36: 4269-4276.
- NRC, 1994. National Research Council. 1994. Nutrient requeriments of poultry. 9th Rev. Ed. Washington: National Academy Press. Ed. Washington: National Academy Press.
- Newberne, P. M., W. A. Carlton y G. N. Wogan. 1964. Hepatomas in rats and hepatorenal injury in ducklings fed peanuts meal or *Aspergillus flavus* extract. *Pathology Veterinary*. 1: 105-132.

- Oguz, H., F. Kurtoglu, V. Kurtoglu y Y. O. Birdane. (2002). Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Research in Veterinary Science*. 73: 101-103.
- Okotie-Eboh, G. O., L. F. Kubena, A. D. Chinnah y C. A. Bailey. 1997. Effects of beta-carotene and canthaxanthin on aflatoxicosis in broilers. *Poultry Science*. 76: 1337-1341.
- Oliveira, C.A., E. Kobashigawa, T.A. Reis, L. Mestieri, R. Albuquerque y B. Correa. 2000. Aflatoxin B<sub>1</sub> residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Additive Contamination*. 17: 459-462.
- Oliveira, C. A. F., R. Ogido, D. R. Ledoux, G. E. Rottinghaus, B. Corrêa, T. Alves y E. Gonçalez. 2007. The quality of eggs from japanese quail, *Coturnix japonica*, fed rations containing aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub>. *Poultry Science*. 44: 29-33.
- Omielinski, C. J., R. P. Remmel y V. P. Hosagrahara. 1999. Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. *Toxicology Science*. 48: 151-6.
- Ortatatli, M., H. Oguz, F. Hatipoglu y M. Karaman. 2005. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Research Veterinary Science*. 78: 61-68.
- Ortíz, R., A. G. Valdivia y G. Acero. 1994. Presencia de AFB<sub>1</sub> en alimentos para animales expendidos en Aguascalientes. *Memorias del Simposio: La investigación y el desarrollo tecnológico en Aguascalientes, I*. 3. Aguascalientes, México.
- Peraica, M., B. Radic, A. Lucic y M. Pavlovic. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*. 77: 754-766.

- Pimpukdee, K., L. F. Kubena, C. A. Bailey, H. J. Huebner, E. Afriyie-Gyawu y T. D. Phillips. 2004. Aflatoxin-induced toxicity and depletion of hepatic vitamin A in young broiler chicks: protection of chicks in the presence of low levels of NovaSil PLUS in the diet. *Poultry Science*. 83: 737-744.
- Prashad, D. N. y N. E. Edwards. 1973. Phosphate excretion in the laying fowl. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 46: 131.
- Prophet E.B., B. Mills, Arrington J. B. y L. H. Sobin. 1994. Laboratory methods in histotechnology. The American Registry of Pathology. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D. C.
- Quezada, T., H. Cuellar, F. Jaramillo-Juarez, A. G. Valdivia y J. L. Reyes. 2000. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on the liver and kidney of broiler chickens during development. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 125: 265-272.
- Quezada, T., F. Jaramillo, A. G. Valdivia, J. L. Reyes, R. Ortiz y M. L. Rodríguez. 2002. Estudio comparativo de la concentración del glutatión reducido y actividades de gammaglutamiltransferasa y transferasa de glutatión en hígado y riñón de pollos y ratas. *Veterinaria México*. 33: 125–135.
- Qureshi, M. A., J. Brake, P. B. Hamilton, W. M. Hagler Jr. y S. Nesheim. 1998. Dietary exposure of broiler breeders to aflatoxin results in immune disfunction in progeny chicks. *Poultry Science*. 77: 812-819.
- Raney, K. D., T. Shimada, D. H. Kim, J. D. Groopman, T. M. Harris y F. P. Guengerich. 1992. Oxidation of aflatoxins and sterigmatocystin by human liver microsomes: significance of aflatoxin Q<sub>1</sub> as a detoxication product of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Chemical Research Toxicology*. 5: 202-210.
- Raju M. V. L. N., S. V. Rama Rao, K. Radhika y A. K. Panda. 2005. Effect of amount and source of supplemental dietary vegetable oil on broiler chickens exposed to aflatoxicosis. *British Poultry Science*. 46: 587–594.

- Ramaiah, S. K. 2007. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chemical Toxicology*. 45: 1551–1557.
- Rauber, R. H., P. Dilkin, L. Z. Giacomini, C. A. Araújo y C. A. Mallmann. 2007. Performance of turkey poult fed different doses of aflatoxins in the diet. *Poultry Science*. 86: 1620–1624.
- Raucy, J. L. 1995. Risk assessment: toxicity from chemical exposure resulting from enhanced. *Toxicology*. 28: 217-224.
- Requena, F., E. Saume y A. León. 2005. Micotoxinas: riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical*. 23: 393-410.
- Resnik, S. K. 1994. Prevención y control de las micotoxinas durante la cadena de postcosecha. The international symposium on grain conservation, Porto Alegre. 1: 55-71.
- Rizzi, L., M. Simioli, P. Roncada y A. Zaghini. 2003. Aflatoxin B<sub>1</sub> and clinoptilolite in feed for laying hens: effects on egg quality, mycotoxin residues in livers, and hepatic mixed-function oxygenase activities. *Journal Food Protection*. 66: 860-865.
- Robbins, S. L., R. S. Cotran, V. Kumar y T. Collins. 2006. Manual de patología estructural y funcional. Ed. McGraw-Hill Interamericana. España.
- Rosiles, R. y A. Pérez. 1981. Consideraciones generales sobre algunas micotoxinas en alimentos para animales domésticos durante los años 1977 a 1980. *Veterinaria México*. 12: 229-233.
- Sabbioni, G, P. L. Skipper, G. Buchi y S. R. Tannenbaum. 1987. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B<sub>1</sub> in vivo in rats. *Carcinogenesis*, 8: 819–824.

- Sampaio, A., J. Horii, M. A. Calori-Domingues, E. Micotti, J. Mastrodi y M. Vizioli. 2004. The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20: 475-481.
- Sanchis, V., P. Scott y J. Farber. 1988. Mycotoxin producing potential of fungi isolated from red kidney beans. *Mycopathology*. 104: 157-162.
- Saturio, J. M. 2000. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2.
- SAS. 1999. Procedures guide for personal computers. CARY, N. C.: SAS Institute, Inc. U.S.A.
- Scholl, P. F., S. M. Musser y J. D. Groopman. 1997. Synthesis and characterization of aflatoxin B<sub>1</sub> mercapturic acids and their identification in rat urine. *Chemical Research Toxicology*. 10: 1144-1151.
- Scott, P. M. 1995. Natural toxins. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry*. 49: 1-30.
- Shi, Y. H., Z. R. Xu, J. L. Feng, y C. Z. Wang. 2006. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*. 129: 138-148.
- Shotwell, O. L., C. W. Heseeltine, R. D. Stubblefield y W. G. Sorenson. 1966. Production of Aflatoxin on Rice. *Applied Microbiology*. 14: 425-428
- Siller, W. G. y R. N. Hindle. 1969. The artificial blood supply to the kidney of the fowl. *Journal of Anatomy*. 194: 117.
- Siller, W. G. 1981. Renal pathology of the fowl -a review. *Avian Pathology*. 10:186-262
- Skadhåuge, E. y B. Schmidt-Nielsen. 1967. Renal function in the domestic fowl. *American Journal of Physiology*. 212: 793.

- Skadhäuge, E. 1981. Osmoregulation in birds. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Snedecor, G. W. y W. G. Cochran. 1967. Statistical Methods. Ed. Ames.
- Song, Z., D. Cawthon, K. Beers y W. G. Bottje. 2000. Hepatic and extra-hepatic stimulation of glutathione release into plasma by norepinephrine in vivo. Poultry Science. 79: 1632–1639.
- Stubblefield, R. D. y L. O. Shotwell. 1981. Determination of aflatoxins in animal tissues. Journal of Association of Analytical Chemistry. 4: 964-968.
- Sturkie, P. D. 1986. Avian physiology. Fourth Edition. Kingsport Press. USA.
- Sumner, J. B. 1944. A method for the colorimetric determination of phosphorus. Science. 100: 413-414.
- Sykes, A. H. 1960. The renal clearance of uric acid and p-aminohippurate in the fowl. Research of Veterinary Sciences. 1: 308.
- Sykes, A. H. 1971. Formation and composition of urine. En: D. J. Bell y B. M. Freeman (Eds.). Physiology and Biochemistry of the fowl. Academic Press. New York, USA.
- Tedesco, D., S. Steidler, S. Galletti, M. Tamani, O. Sonzogni y L. Ravarotto. 2004. Efficacy of silymarin-phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler chicks. Poultry Science. 83: 1839–1843.
- Tessari, E. N., C. A. Oliveira, A. L. Cardoso, D. R. Ledoux y G. E. Rottinghaus. 2006. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. British Poultry Science. 47: 357-364.
- Tietz, N. W. 1999. Clinical guide to laboratory tests. 3<sup>a</sup> edición. Saunders Co.
- Tudor D. C. 1979. Congenital defects of poultry. Journal World Poultry Science. 35:20-26.

- Tung, H.T., R.D. Wyatt, P. Thaxton y P.B. Hamilton. 1973. Impairment of kidney function during aflatoxicosis. *Poultry Science*. 52: 873-878.
- Valdivia, A. G., A. Martinez, F. J. Damian, T. Quezada, R. Ortiz, C. Martinez, J. Llamas, M. L. Rodriguez, L. Yamamoto, F. Jaramillo, M. G. Loarca-Pina y J. L. Reyes. 2001. Efficacy of N-acetylcysteine to reduce the effects of aflatoxin B<sub>1</sub> intoxication in broiler chickens. *Poultry Science*. 80: 727-734.
- Vander, A. J. 1993. *Fisiología renal*. 4<sup>a</sup>. Edición. Interamericana-McGraw-Hill. México.
- Voigt, M. N., R. D. Wyatt, J. C. Ayres y P. E. Koehler. 1980. Abnormal concentrations of B vitamins and amino acids in plasma, bile, and liver of chicks with aflatoxicosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 40: 870–875.
- Vogel, J. A., y P. D. Sturkie. 1963. Cardiovascular responses on chicken to seasonal and induced temperature changes. *Science*. 140: 1404.
- Walker, J. R. y J. P. Fawcett. 1993. Drug nephrotoxicity. The significance of cellular mechanisms. En: Ernest, J., y B. V. Basel (Eds.). *Progress in Drugs Research*. USA.
- Wang, J. S. y J. D. Groopman. 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research*. 424: 167-181.
- Wang, C., T. K. Bammler, Y. Guo, E. J. Kelly y D. L. Eaton. 2000. Mu-class GSTs are responsible for aflatoxin B<sub>1</sub>-8,9-epoxide-conjugating activity in the nonhuman primate *macaca fascicularis* liver. *Toxicology Science*. 56: 26-36.
- Waters, N. F. y J. H. Bywaters. 1943. A lethal embryonic wing mutation in the domestic fowl. *Journal of Heredity*. 34: 213–7
- Wideman, R. E., E. J. Braun y G. L. Anderson. 1981. Microanatomy of the domestic fowl renal cortex. *Journal of Morphology*. 168: 249.

- Wild, C. P. y P. C. Turner. 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*. 17: 471-481.
- Williams, R. H. 1984. *Tratado de endocrinología*. 6ª Edición. Interamericana. Madrid, España.
- Wlodek, P., M. Sokolowska, O. Smolenski y L. Wlodek. 2002. The  $\gamma$ -glutamyltransferase activity and non-protein sulfhydryl compounds levels in rat kidney of different age groups. *Acta Biochimica Polonica*. 49: 501–507.
- Wogan, G. N. 1992. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Research*. 52: 2114-2118.
- Yarru, L., R. Settivari, E. Antoniou, D. Ledoux y G. Rottinghaus. 2009. Toxicological and gene expression analysis of the impact of aflatoxin B<sub>1</sub> on hepatic function of male broiler chicks. *Poultry Science*. 88: 163–371.
- Young, D. S. 1995. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*. 4ª edición. AACCC Press.
- Zaghini, A., G. Martelli, P. Roncada, M. Simioli y L. Rizzi. 2005. Mannanligosaccharides and aflatoxin B<sub>1</sub> in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> residues in eggs, and aflatoxin B<sub>1</sub> levels in liver. *Poultry Science*. 84: 825-832.
- Zinedine, A., C. Juan, J. M. Soriano, J. C. Molto, L. Idrissi y J. Manes. 2007. Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. *International Journal of Food Microbiology*. 115: 124-127.