



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LOS ALUMINOSILICATOS Y DE LA
AFLATOXINA B1 DIETETICOS SOBRE LA
CONCENTRACION DE GLUTATION SANGUINEO
EN EL POLLO DE ENGORDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MARISA REYES QUIROZ



ASESORES:

MSc. MVZ. ALMA E. ROCHA HERNANDEZ

MC. SERGIO CORONA GARCIA

DRA. MARTHA ZENTELLA DE PIÑA

MEXICO, D. F.

1993

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1

I INTRODUCCIÓN	3
-----------------------------	----------

1.1. MARCO TEÓRICO

1.2. Glutación: Generalidades y antecedentes.

Historia

Características fisicoquímicas

Métodos de cuantificación

Importancia

1.3. Aflatoxicosis.

Definición

Epizootiología

Etiología

Signos y lesiones

Patogenia

Diagnóstico

Tratamientos (Sales de aluminosilicatos).

1.4. Síndrome Ascítico

Definición

Epizootiología

Etiología

Signos y lesiones

Patogenia

Diagnóstico

Tratamiento (programa de restricción alimenticia).

1.5 Hipótesis

1.6 Objetivos

II MATERIAL Y METODOS24

- 2.1. Diseño del experimento I con aflatoxina B1 y aluminosilicatos.
- 2.2. Diseño del experimento II con el programa de restricción de alimento y aluminosilicatos.

III. RESULTADOS33

IV DISCUSION36

FIGURAS42

1. Efecto de la aflatoxina B1 y/o de los ALS sobre las concentraciones de glutatión total ($\mu\text{mol/ml} \pm \text{error estándar}$), durante las 1ª, 4ª y 8ª semanas de vida del pollo de engorda.

2. Efecto de la aflatoxina B1 y/o de los ALS sobre las concentraciones de glutatión reducido ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar), durante las 1ª, 4ª y 8ª semanas de vida del pollo de engorda.
3. Efecto de la aflatoxina B1 y/o de los ALS sobre las concentraciones de glutatión oxidado ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar), durante las 1ª, 4ª y 8ª semanas de vida del pollo de engorda.
4. Efecto de la aflatoxina B1 y/o de los ALS sobre las concentraciones de glutatión ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) total (GT) y glutatión reducido (GSH), del pollo de engorda a la cuarta semana de edad.
5. Efecto de la aflatoxina B1 y/o de los ALS sobre las concentraciones de glutatión ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) total (GT) y glutatión reducido (GSH), del pollo de engorda a la 8ª semana de edad.
6. Efecto del programa de restricción alimenticia y/o de los ALS sobre las concentraciones de glutatión total ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar), durante las 1ª, 4ª y 8ª semanas de vida del pollo de engorda.

7. Efecto del programa de restricción alimenticia y/o de los ALS sobre las concentraciones de glutatión reducido ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar), durante las 1ª, 4ª y 8ª semanas de vida del pollo de engorda.
8. Efecto del programa de restricción alimenticia y/o de los ALS sobre las concentraciones de glutatión oxidado ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar), durante las 1ª, 4ª y 8ª semanas de vida del pollo de engorda.
9. Efecto del programa de restricción del alimento y de los ALS sobre las concentraciones de GT y GSH ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar), en el pollo de engorda durante la 4ª semana del experimento II.
10. Efecto del programa de restricción del alimento y/o de los ALS sobre las concentraciones de GT y GSH ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar), en el pollo de engorda durante 8ª semana del experimento II.

CUADROS52

1. Diseño Experimental 3x3 factorial con nueve tratamientos, en el que se evaluó el efecto de la AFB1 y los ALS sobre el pollo de engorda.
2. Diseño experimental 2x2 factorial con cuatro tratamientos en el que se evaluó el efecto del programa de restricción de alimento y de los ALS sobre el pollo de engorda.
3. Ingredientes y análisis químico proximal del alimento de iniciación para pollo de engorda de la primera a la cuarta semana del experimento II.
4. Ingredientes y análisis químico proximal del alimento de finalización para pollo de engorda de la cuarta a la octava semana del experimento II.
5. Concentraciones de glutatión total (GT), reducido (GSH) y oxidado (GSSG) ($\mu\text{mol/ml}$ de sangre) de pollos alimentados con AFB1 y ALS, hasta la octava semana del experimento I.

6. Conversión alimenticia, ganancia de peso y consumo de alimento a la 8ª semana en el pollo de engorda sometido a diferentes concentraciones de aflatoxina B1 y de aluminosilicatos del experimento I.
7. Concentraciones de glutatión total (GT), reducido (GSH) y oxidado (GSSG) ($\mu\text{mol/ml}$ de sangre) de pollos sometidos al programa de restricción de alimento y ALS, hasta la 8ª semana del experimento II.
8. Conversión alimenticia, ganancia de peso, consumo de alimento y el % de mortalidad por Síndrome Ascítico, a la octava semana en el pollo de engorda sometido al programa de restricción alimenticia con o sin ALS del experimento II.

V. LITERATURA CITADA64

RESUMEN

REYES QUIROZ, MARISA. Efecto de los aluminosilicatos y de la aflatoxina B1 dietéticos sobre la concentración de glutatión sanguíneo en el pollo de engorda.(Bajo la dirección de: MSc.MVZ. Alma Eugenia Rocha H., MC. Sergio Corona García., Dra. Martha Zentella de Piña).

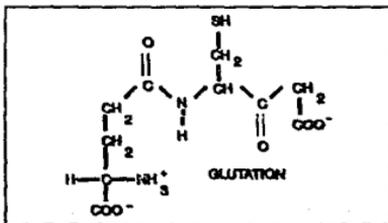
Se realizaron dos experimentos en el pollo de engorda. El primero: para evaluar la eficacia de los aluminosilicatos (ALS) como reductores de la disponibilidad de la aflatoxina B1 (AFB1). El segundo: para evaluar si el programa de restricción de alimento en etapa temprana disminuye las concentraciones de glutatión sanguíneo. Por medio de la cuantificación de las concentraciones sanguíneas de total (GT), glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), en la primera, cuarta y octava semanas de edad en el pollo, la muestra se analizó por espectrofotometría siguiendo el método de Akerboom (1), y se compararon con los parámetros productivos (ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad). Los resultados muestran que los ALS no tienen un papel protector importante en las aves que consumieron 300ppb de AFB1 con 0.5% o 1.0% de ALS durante un período de ocho semanas, en cambio estas sales si mostraron un efecto nocivo sobre las concentraciones de GT a la octava semana ($P < 0.01$). La AFB1 redujo la ganancia de peso y las concentraciones de glutatión GT ($P < 0.01$ y $P < 0.005$ respectivamente). El programa de restricción alimenticia redujo la mortalidad (26%)

con respecto al control, siendo el grupo en el que se aplicó la restricción y el grupo control, los que presentaron mayores concentraciones de GT y GSH ($P < 0.01$). La concentración de glutatión sanguíneo de los pollos control permaneció constante durante los 56 días que duración los experimentos. La cuantificación de glutatión sanguíneo es un método que permite evaluar la capacidad de eliminación de los xenobióticos y metabolitos de desecho que utilizan el sistema del glutatión como vía de detoxificación en el organismo. Este trabajo se realizó con el apoyo del proyecto del DGAPA IN-208992.

I. INTRODUCCION

1.2. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES DEL GLUTATION

El glutatión es un tripéptido tiolizado, que se encuentra en la mayoría de las células participando en múltiples funciones (1). El glutatión fue aislado en 1921 por Frederick Gowland Hopkins; y en 1929 Pice y *col.* determinan su estructura por medio de análisis químicos con ácidos y bases estableciendo que se trataba de la unión de tres aminoácidos no esenciales: glicina, ácido glutámico y cisteína. A continuación se presenta su fórmula condensada:



En 1953 Colowick y *col.* estudian sus propiedades químicas, su transformación metabólica, sus funciones como coenzima y su relación con entidades patológicas. En 1973 Flohe y *col.* proponen el ciclo de la γ -glutamilcisteína y su función como protector de membranas plasmáticas.

En 1976 Arias y Jakoby enfatizan la relación del glutatión con el metabolismo de drogas y compuestos endógenos en el hígado, tema que se

retomó en 1978 por Sies y Wendel, y que hasta la fecha sigue siendo motivo de estudio (26).

PROPIEDADES FÍSICO - QUÍMICAS

El glutatión en su forma reducida (GSH) es un cristal blanquecino con un peso molecular de 307.33. Es soluble en agua y en etanol; en su forma oxidada (GSSG) es un cristal blanquecino, su peso molecular es de 642.6 y también es soluble en agua.

Este tripéptido tiene grupos ácidos y básicos con un pK para la glicina (COOH) de 3.7, para γ -glutamina (NH₂) 9.5 y para la cisteína (SH) 9.2 (26).

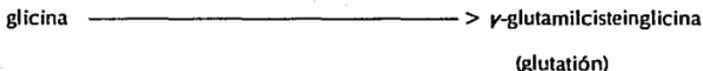
SÍNTESIS DE GLUTATION

La síntesis se realiza principalmente en el hígado, de donde posteriormente es transportado al resto de las células. En la síntesis intervienen diferentes enzimas, la γ -glutamil cisteinsintetasa (γ -glutamato cistein ligasa) es la primera enzima que participa en este proceso y su actividad se ve duplicada ante niveles bajos de Se, promoviendo la síntesis *de novo* a partir de la cisteína como fuente de grupos tiolizados (24,49).

glutamato cistein γ -ligasa



γ -glutamilcisteinglicina-ligasa



El glutati3n interviene en los procesos de oxidoreducci3n que est3n mediados por dos grupos enzim3ticos b3sicos:

- a) Las reductasas (dentro de las que se encuentran la glutati3n reductasa y la tioredoxina reductasa), son mol3culas por medio de las cuales se realiza la siguiente reacci3n:



El RSH se genera por la transhidrogenaci3n del H^+ del NADPH^+ hacia el RSSR por medio de la tioltransferasa.

- b) Las oxidasas principales son la glutati3n peroxidasa, la catalasa, y el mercapto piruvato transulfurasa. La primera de estas enzimas revierte la ecuaci3n anterior y todas tienen como objetivo principal neutralizar la citotoxicidad

de moléculas altamente reactivas a las que se les ha llamado "radicales libres" (52).

RADICALES LIBRES

Los radicales libres (R·) son moléculas independientes que poseen un electrón impar en el último orbital que las hace moléculas inestables, capaces de asociarse con cualquier átomo, siendo por esto, altamente tóxicos (21).

La peroxidación de lípidos insaturados se ha estudiado en la grasa y aceites que se oxidan (enrancian) al permanecer expuestos al aire, pero el estudio de la peroxidación se ha extendido a los organismos biológicos por la variedad de enfermedades en que se involucran (10, 40).

Los compuestos implicados en el daño celular son principalmente compuestos relacionados con el oxígeno (10). Algunos de los más comunes son: el ión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH·), el hidropéroxido (HO_2), el péroxido de hidrógeno (H_2O_2), el péroxido lipídico (ROO·), y el oxígeno (O_2), de los cuales el OH· es de los más tóxicos, tiene un radio de acción de 30 Å a nivel local inicialmente, y su daño se extiende al generar más radicales libres (reacción en cadena):



Los radicales se forman durante los procesos metabólicos de la célula durante la cascada de la cadena respiratoria, por la reducción incompleta de las moléculas, y por la transformación de los xenobióticos (31, 40).

Los radicales libres se unen a los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana formando dienos conjugados, proceso que puede ser cuantificado por la formación de malondialdehído (40).

FACTORES QUE INCREMENTAN LA FORMACION DE RADICALES.

La ausencia de glucosa disminuye las concentraciones de GSH por lo que las células blanco quedan más expuestas al daño por radicales (2); La radiación ionizante ; la formación de enlaces homolíticos:

$A:B \longrightarrow A\bullet + B\bullet$; el O_3 , los iones de Fe^{2+} y Cu^{2+} pueden incrementar el daño por radicales (40), y por los polimorfonucleares quienes liberan H_2O_2 (21). Dentro del mecanismo de oxidación se reduce la concentración de ATP y $NADPH^+$, se depleta el GSH por lo que los niveles de Ca^{2+} intracelular aumentan estimulando proteasas que filtran iones metálicos exacerbando la lipoperoxidación (21, 29).

Algunos de los métodos para detectar a los radicales libres son la espectroscopía, por los medios indirectos también se evalúa la lipoperoxidación a través del malondialdehído (MDA) o del dinitrofenilo que es proporcional al MDA (10).

ANALISIS Y CUANTIFICACION DEL GLUTATION

Hay varios métodos para la determinación de los péptidos que conforman al glutatión se han desarrollado las técnicas de cromatografía con detección electroquímica (37) así como los métodos enzimáticos, con el fin de obtener valores precisos sobre las concentraciones de glutatión, que en el caso del GSSG son muy pequeñas (44).

Para cuantificar el glutatión de cualquier muestra se requiere homogeneizar, desproteínizar y precipitar las proteínas lo cual se realiza por medio de ácidos fuertes, calor, etanol, o del etanol mas cloroformo para liberar los tioles solubles principalmente de glutatión (GSH) y cisteína (1, 26, 52).

CONCENTRACIONES DE GLUTATION

El contenido de glutatión celular es la suma de todas sus posibles presentaciones: glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG); y en mezclas de disulfuros unido a proteínas (cisteína y CoA).

La concentración de glutatión esta sujeta a la regulación hormonal y nutricional (1, 22).

En condiciones normales el GSH se encuentra en una concentración de 2 a 3 mM en el caso de los eritrocitos de mamífero y puede estar libre dentro de la célula desde 0.5 hasta 10 mM, el GSSG esta en menor concentración desde 0.5 hasta 50 μ M alcanzando 1-5 mM. Esta concentración varia de acuerdo al tipo de tejido.

Tejido	*GSH	GSSG	* vida media (h)
Eritrocitos de mamífero	2-3 mM	0.005-0.130 mM	65-96
Hígado de rata	4.5-6.5 mM	0.03-0.4 mM	
Hígado de ratón	3 mM	0.08 mM	
Hígado de feto de ratón	8.7 mM	0.44 mM	

Concentraciones y vida media de glutatión reducido y oxidado presentes en algunos mamíferos (1,26,44).

Akerboom encontró una relación de GSH/GSSG en el hígado de 300 (1); Harisch reporta una proporción del 1-2% que disminuye por el ayuno debido a que se reduce la síntesis de glutatión por la falta de cisteina (22). Las concentraciones de glutatión

total en sangre de humano y de rata son de 1.5 mg/ml y 1.2 mg/ml de sangre respectivamente (22,44).

En el tejido nervioso el GSSG constituye un 0.7% del glutatión total (GT), y se eleva hasta el 1.5% en procesos de isquemia (17).

Para evitar el daño por radicales existen además del sistema del glutatión, otras sustancias como las vitaminas E y C, la citocromo oxidasa, la cisteína, el selenio, la superóxido-dismutasa y la glutatión peroxidasa (quelante de Ca^{2+} y de iones metálicos) (21).

FUNCIONES CELULARES DEL GLUTATION

1. Protege la integridad estructural y funcional de las células evitando la peroxidación lipídica de los ácidos grasos insaturados interceptando radicales libres y descomponiendo los hidroperóxidos.
2. Regula la actividad enzimática de la célula normal (2,21,52).
3. Interviene en la liberación de neurotransmisores dado que las células nerviosas tienen concentraciones elevadas de glutatión probablemente el ácido glutámico intervenga en los procesos de liberación de neurotransmisores (1,26,52).

4. La respuesta celular a inductores de mitosis esta relacionada con la concentración de GSH, quien interviene en la liberación de Ca^{2+} necesario para iniciar la mitosis (29).
5. Modula la conformación y síntesis protéica manteniendo los niveles de tioles en las proteínas (1,26,52).
6. Participa en la síntesis de las macromoléculas de DNA y RNA. Algunos pasos en la síntesis de nucleótidos se afectan por las bajas concentraciones de GSH o por el aumento de GSSG. Para la síntesis de DNA y RNA el GSH puede donar H^{+} para reducir los ribonucleótidos en el sistema con NADPH^{+} , GSSG reductasa, GSH y glutaredoxina (26,52).
7. Metabolismo de agentes electrofílicos (radicales libres). El glutatión forma compuestos conjugados que son excretados como tal o se metabolizan como ácido mercaptúrico y se eliminan así por la orina y la bilis, dentro de estos compuestos electrofílicos se mencionan a los organofosforados, a las quinonas, a los compuestos insaturados y los epóxidos. Muchos de estos compuestos reactivos se producen por oxidación del compuesto original en el hepatocito, como sucede con los epóxidos (10, 40). La conjugación se realizan por medio de: la glutatión S-epoxidotransferasa, glutatión S-alkil transferasa, y la glutatión S-transferasa (6,52).

8. El glutatión interviene en la síntesis de hormonas esteroideas y de las prostaglandinas E_2 y $F_2\alpha$ (18). También interviene en el transporte de hormonas, de bilirrubina y de pigmentos a través de la membrana (26).

9. El glutatión modula la sensibilidad a los rayos X. Hay dos formas en que la célula se afecta por la radiación: a) disminuyendo la concentración de los tioles intracelulares incrementando el daño por radicales. b) interceptando electrones que producen radicales menos tóxicos que el hidroxilo pero dañinos al sistema biológico las dosis bajas de radiación tienen efectos reversibles (1,26).

10. El glutatión interviene en la homeostasis de Ca^{2+} (29,52).

11. Neutraliza los peróxidos que se liberan por los macrófagos y las células líticas del sistema inmune en el caso de células oncogénicas (26).

La perturbación en la concentración normal del glutatión es muy evidente pues se observan fallas en la síntesis proteica, en el transporte de iones, de aminoácidos, de hormonas, en la integridad de la membrana, en anemia, y en la disminución en la capacidad de eliminación de compuestos tóxicos. Estas alteraciones se pueden provocar por deficiencia de vitamina C, E y ó selenio, por fallas genéticas o por inducción de sustancias ajenas al organismo que generalmente provocan una disminución de la concentración de GSH, por ayunos prolongados, en

períodos de isquemia (30 min) disminuye la concentración de GSH del 7-10 por ciento y en la reperfusión de oxígeno se incrementa el GSSG, a edad avanzada se ha reportado que las concentraciones de antioxidantes disminuye aumentando el daño por radicales (11,26,32,49).

1.3. AFLATOXICOSIS

Uno de los compuestos que es eliminado por el glutatión es la aflatoxina B1 (AFB1); la cual es producida por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* que crecen en diversos productos alimenticios y forman parte de la microflora del aire y del suelo y son causa de deterioro del alimento almacenado en forma inadecuada (38,46,48).

La ingestión de aflatoxinas produce la aflatoxicosis, que es una enfermedad de primera importancia en la salud pública y en la salud animal, y en la productividad agropecuaria, por la posibilidad de que los residuos tóxicos de granos o animales penetren a la cadena alimenticia humana (48).

Este problema existe desde que se almacena el alimento para su posterior utilización. Las toxinas ejercen efectos indeseables en el organismo, alterando los parámetros productivos.

Se conocen mas de 120 especies de hongos productores de toxinas, de las cuales la mas importante es la aflatoxina B1 (AFB1) por su incidencia en el alimento y su capacidad carcinogénica.

Se desarrolla en alimentos ricos en carbohidratos o grasas, que estén a una temperatura entre 34 ± 4 °C., con humedad mínima de 18.3% y con 85% de humedad relativa. El *Aspergillus flavus* es el único hongo que requiere de dicho porcentaje de humedad por la que disminuye la competencia con otras especies fungales (47, 49).

La AFB1 es un metabolito secundario, heterocíclico altamente oxigenado, químicamente considerado como una bisfuranoisocumarina, se encuentra en el alimento, dentro de la fracción lipídica, resiste hasta 300 °C, es insoluble en agua, y soluble en solventes orgánicos se destruye por álcalis, por ácidos fuertes, por agentes oxidantes y con luz ultravioleta (48).

La AFB1 interfiere con el desarrollo de la inmunidad posiblemente por la unión defectuosa con el antígeno. Promueve la disminución de proteínas séricas hasta en una tercera parte principalmente de prealbumina, albúmina y la fracción G de la inmunoglobulina, predisponiendo a otras enfermedades infecciosas (8,15,48).

En casos agudos de aflatoxicosis se observa anorexia, melena, ocasionalmente signos nerviosos, ataxia y muerte. En casos crónicos hay disminución del apetito, baja ganancia de peso disminuye la tasa de crecimiento y aumenta la conversión alimenticia de 2.0 hasta 2.4, este parámetro es importante pues indica la mala utilización de los nutrimentos y aumenta la tasa de mortalidad, los signos se pueden observar por consumo de alimento contaminado con AFB1 desde 0.625ppm hasta 10ppm con los respectivos incrementos en la intensidad de los signos y las lesiones (14,38,50).

PATOGENIA DE LA AFLATOXÍCOSIS

La base de la toxicidad de la AFB1 radica en la formación de enlaces covalentes con moléculas de alto peso molecular (DNA y RNA), razón por la que es considerada altamente oncogénica (6,15). La AFB1 requiere de la activación metabólica para manifestar su toxicidad (6). Se piensa que su radical 2,3 epóxido es el metabolito más activo. La desintoxicación se realiza por tres fases (45):

1. Oxidación: La AFB1 es bioactivada por un monooxigenasa (mediante NADPH) otro activador metabólico es el citocromo p450 formando AFB1-8,9-epóxido, que se une al séptimo nitrógeno de la guanina (base del DNA) (6,19).
2. Conjugación: Este epóxido se conjuga con el glutatión reducido formando AFB1 (19,20).
3. Excreción: El conjugado es eliminado del hepatocito por los conductos biliares por medio de la bomba de la GS-X ATP dependiente.

La AFB1 inhibe la síntesis protéica interfiriendo con la incorporación de isoleucina a la proteína, observándose una pérdida en la granulación del retículo endoplásmico rugoso que se puede detectar a los dos días post-intoxicación (50).

Las aves más susceptibles a la aflatoxicosis son: el pato, el pavipollo, el ganso, el faisán y el pollo (38).

En los pollos intoxicados, las lesiones que se observan a la necropsia son hepatomegalia, esplenomegalia, atrofia de la bolsa de Fabricio y del timo petequias subcapsulares en hígado, fragilidad capilar con una dosis de 0.625 ppm y muerte súbita con 5 ppm en el pollo de engorda. En las gallinas ponedoras disminuye la producción de huevo y la incubabilidad (8,27).

A la histopatología, se observa degeneración y vacuolización del hígado e hiperplasia de conductos biliares (47).

Son factores predisponentes a la aflatoxicosis, la mala preparación de silos, y las fallas en el método de almacenaje que favorezcan el desarrollo micótico (38).

El diagnóstico se hace por aislamiento y caracterización de la AFB1 que se puede extraer por medio de solventes, la separación se puede realizar por cromatografía de capa fina y se detectan en fluorescencia con luz ultravioleta.

Purwoko (1991), realizó un estudio para conocer las concentraciones presentes de AFB1 en el alimento mediante el monitoreo de diferentes granjas y observó que el 91% de las muestras tenían de 22 a 617 ppb de aflatoxinas, y el 100% fueron positivas a AFB1 con 36 a 71 ppb (34).

Entre las estrategias de detoxificación de aflatoxina en el alimento que se han usado son los aluminosilicatos (ALS), los que tienen afinidad por este compuesto secuestrando la AFB1 (33).

Estudios *in vivo* han demostrado que los ALS previenen del efecto tóxico de la AFB1 en los pollos (13,23,27).

El mecanismo de acción parece ser el secuestro y la adsorción química de la AFB1 en el tracto intestinal dando como resultado una mayor reducción de la disponibilidad y la toxicidad de la AFB1 (33).

Kubena, (1990) ha utilizado los ALS al 0.5% en la dieta logrando disminuir los danos por AFB1 (27).

Los ALS se obtienen como resultado de la reacción de la solución alcalina de silicatos y de ácidos minerales.

Se recomienda, como medidas primordiales para la prevención de la aflatoxicosis, el utilizar materias primas almacenadas en forma adecuada y realizar pruebas para detectar la presencia de aflatoxinas en el alimento (14). La cuantificación de glutatión en sangre nos puede indicar de manera indirecta la eficacia de los ALS como secuestradores de AFB1, ya que en base a las concentraciones de este tripéptido podemos evaluar la capacidad depurativa del organismo ante diferentes xenobióticos.

1.4. SINDROME ASCÍTICO.

El Síndrome Ascítico (SA) es una entidad de etiología multifactorial con características epizootológicas clínicas y anatómo-patológicas constantes, afecta

principalmente al pollo de engorda, siendo los mas afectados aquellos de crecimiento acelerado.

El SA se presenta desde la 3a semana produciendo la mayor mortalidad a la 6a semana (2 - 40%). Se ha reportado en Europa, Africa y América (3,5). En México en 1976 aumento marcadamente la incidencia y severidad del padecimiento, coincidiendo con el avance en la selección genética de animales con un desarrollo muscular mas acelerado (5).

Entre los principales factores predisponentes al SA se encuentra el desbalance entre la tasa de crecimiento corporal del pollo y la baja velocidad de maduración de los sistemas fisiológicos responsables de sostener esta tasa de crecimiento (3,5).

Se incrementa durante el invierno probablemente porque aumenta el metabolismo basal, y disminuye la ventilación, afectando la calidad del aire (incrementa el porcentaje de amoníaco a 11.4ppm de CO_2 a 70ppm SH_2 y CH_4 de las deyecciones), así como los cambios de temperatura muy bruscos que predisponen a problemas respiratorios. Por lo que los problemas ambientales y nutricionales tienen un papel importante en esta entidad (3,5).

PATOGENIA DEL SINDROME ASCITICO

El problema es originado por los estados de hipoxia que pueden presentarse por diferentes factores como la descompensación orgánica, la altura sobre el nivel del mar por arriba de 1500m, entre otros (3,5) que produce vasoconstricción de las arteriolas pulmonares (por arco reflejo) para tratar de aumentar la perfusión y la difusión de sangre en los pulmones, dificultando el flujo de sangre hacia el parénquima pulmonar. La sangre se acumula en arterias pulmonares y en el ventrículo derecho provocando aumento de la presión hidrostática, éstasis sanguínea en el sistema venoso, y extravasación de plasma que producen hidropericardio y ascitis (9).

Entre los signos que se pueden observar son la distensión progresiva del abdomen causado por el acúmulo de trasudado en la cavidad toraco-abdominal (edema), en estados avanzados hay jadeo, cianosis de la cresta y de las barbillas, letargia, plumaje erizado, diarrea y caminar con dificultad.

Los pollos con SA presentan a la necropsia dilatación cardíaca derecha, cardiomegalia excéntrica, hidropericardio, congestión venosa generalizada, y ascitis.

El diagnóstico se constata por la presencia de ascitis e hidropericardio en ausencia de lesiones pulmonares o hepáticas que pudieran obstaculizar el flujo sanguíneo. Es necesario corroborar la presencia de hipertrofia en las ramificaciones

de la arteria pulmonar que es la única causante de la obstrucción del flujo sanguíneo proveniente del ventrículo derecho provocando insuficiencia cardíaca congestiva (9).

Las medidas de control a nivel de producción que han funcionado son limitar la velocidad de crecimiento por medio de recursos nutricionales, entre estos los mas usados son la limitación del tiempo de acceso al alimento y en menor medida, el uso de alimentos de baja concentración de nutrimentos durante parte de la vida del ave.

En los últimos años se ha podido establecer que el retraso de crecimientos de mayor utilidad durante las etapas tempranas de la vida del pollo (43).

Modular el crecimiento junto con el mantenimiento de condiciones ambientales y sanitarias apropiadas, ayuda a la eliminación de gran parte de la mortalidad asociada con el SA sin embargo esto implica a veces aumentar la edad de sacrificio necesaria para obtener un peso corporal determinado (5,42).

El programa que se seleccione para modular la velocidad de crecimiento debe adaptarse a cada granja para tener mejor equilibrio entre las ventajas y desventajas del sistema (3).

Para calcular el efecto que los patrones de restricción tienen sobre el organismo del ave se propone evaluar los parámetros productivos (CA, GP, y la mortalidad) y la concentración de glutatión sanguíneo durante el período en estudio.

1.5. HIPOTESIS

1. Si el pollo de engorda consume aflatoxina B1 (AFB1) combinada con aluminosilicatos en el alimento, entonces apreciaremos cambios detectables en sus concentraciones de glutatión sanguíneo con respecto a los pollos que solamente consumen AFB1 y con respecto a los pollos que consumen alimento no contaminado.
2. Si al pollo de engorda se le raciona el alimento con o sin aluminosilicatos entonces se apreciarían cambios detectables en su concentración de glutatión sanguíneo con respecto a los pollos que consumen alimento *ad libitum* con o sin aluminosilicatos.

1.6 OBJETIVOS

1. Conocer las concentraciones de glutatión sanguíneo en el pollo de engorda sano por medio del método enzimático de Akerboom (1).

2. Conocer si la aflatoxina B1 por sí sola, o asociada con los aluminosilicatos alteran las concentraciones de glutatión sanguíneo.
3. Conocer el efecto de la restricción de alimento y de la adición de aluminosilicatos sobre la concentración de glutatión en sangre.

II MATERIAL Y METODOS

2.1. EXPERIMENTO I

a. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron 186 pollos de engorda de un día de edad para realizar dos experimentos.

El primer experimento fue llevado a cabo en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal de aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Fueron utilizados 84 pollos de un día de edad de la estirpe Arbor aces del Centro de enseñanza, investigación y extensión avícola, cunícula y de bioterio, (Granja Veracruz) de la FMVZ de la UNAM.

Fue utilizado el sistema de crianza convencional en piso:
Durante los tres primeros días fueron mantenidos en el mismo rodete se utilizo viruta de madera para aislarlos del frío del piso. Se les proporcionó agua y alimento a libre acceso y al cuarto día se distribuyeron en nueve corrales de 50cm x 60cm.

La temperatura fue mantenida a 30 ± 2 °C por medio de una criadora de gas durante las primeras dos semanas. A partir de la tercera semana se redujo a 24 ± 2 °C y de la cuarta a la octava semana permanecieron a temperatura ambiente (18 ± 2 °C).

Fueron instalados bebederos automáticos de copa y comederos de línea de 55cm x 8cm en cada uno de los nueve corrales.

Calendario de iluminación: Se mantuvieron bajo 21 ± 1 h de luz por día con un foco de 75 watts de luz blanca.

Ventilación: Se prendió el extractor de la cuarta semana en adelante durante 2 horas diarias.

Vacunación: Se les aplicó la vacuna contra la Enfermedad de Newcastle virus vivo cepa Lasota a la primera semana de edad, poniendo una gota (0.03 ml) por vía ocular (35).

b. ALIMENTACION

El alimento se obtuvo de la Granja Veracruz y se proporcionó *ad libitum*. Se utilizó alimento de iniciación, de la primera a la cuarta semana y alimento de desarrollo de la cuarta a la octava semana.

c. AFLATOXINA B1

La aflatoxina B1 se obtuvo a partir de siembras en maíz estéril (usado como sustrato) inoculado con *Aspergillus flavus* y se incubó a 24 C durante 15 días. Durante este período se fue midiendo la concentración de aflatoxina hasta obtener su máxima concentración. A partir de la cual se hicieron las diluciones de 50 ppb y 300 ppb. en el alimento.

d. ALUMINOSILICATOS

Se obtuvieron por medio de la compañía Arcillas tratadas de México, usándolos en mezcla con el alimento en proporciones recomendadas por el productor (0.5% y 1.0%).

e. TRATAMIENTOS

Se utilizó un diseño 3x3 factorial con nueve tratamientos: (este diseño se presenta en el Cuadro 1).

A (control)

B(50ppb AFB1)

C(300ppb AFB1)

D(0.5% ALS)

E(1.0% ALS)

F(50ppb AFB1+0.5%ALS)

G(50ppb AFB1+ 1.0%ALS)

H(300ppb AFB1 + 0.5% ALS)

I(300ppb AFB1 + 1.0% ALS)

f. PARAMETROS EVALUADOS

- a) Concentraciones de glutatión sanguíneo se obtuvieron de 1 a 2 ml a partir de la vena braquial de cada uno de los pollos.

- b) **Parámetros productivos:** 1.Peso corporal (ganancia de peso GP) 2.Consumo de alimento 3.Conversión alimenticia y 4.Mortalidad.

La sangre se mezcló con 5 unidades de heparina/ml, y se desproteinizó con ácido perclórico 2M + EDTA 4mM en proporción de 1:1 (un ml de sangre por un ml de ácido perclórico).

Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, para calcular la concentración de glutatión a partir del sobrenadante y se cuantificó por el método de Akerboom (1).

El peso corporal se obtuvo pesando a los animales individualmente, la GP se obtuvo dividiendo el peso de los animales (Kg) entre la edad en días. La CA se obtuvo

dividiendo los kg de alimento consumidos durante el período en estudio, entre el peso corporal del ave kg. La mortalidad se registró diariamente para calcular posteriormente el porcentaje acumulado hasta la octava semana octava semanas de edad.

Fueron obtenidas doce muestras sanguíneas de la primera semana de edad para calcular la concentración basal de glutatión.

A la cuarta semana fueron tomadas muestras sanguíneas de: seis animales de los tratamientos:

A (control)

D (0.5% de ALS en el alimento)

E (1.0% de ALS en el alimento)

tres animales de los tratamientos:

F (0.5% de ALS y 50 ppb de AF B1 en el alimento)

G (1.0% de ALS y 50 ppb de AF B1 en el alimento)

H (0.5% de ALS y 300 ppb de AF B1 en el alimento)

I (1.0% de ALS y 300ppb de AF B1 en el alimento)

B (50 ppb de AF B1 en el alimento)

C (300ppb de AF B1 en el alimento)

Posterior al sangrado se sacrificaron para observar lesiones en la necropsia.

Para la octava semana se repitió el método de la toma de muestras sanguíneas y la determinación de glutatión.

2.2. EXPERIMENTO II.

El experimento II se llevó a cabo en la granja comercial El Jabalí, localizada en el Municipio de Nopala de Villagran Hidalgo.

a. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron 108 pollos de engorda de la estirpe Peterson. Fue utilizado el sistema de crianza convencional en piso: se mantuvieron en el un rodete durante los primeros tres días usando como cama viruta de madera, se les dio agua y alimento a *ad libitum*, y la temperatura se mantuvo de 26 ± 2 °C. durante la primera semana, posteriormente permanecieron a temperatura ambiental. A partir del tercer día se distribuyeron en cuatro corrales de 2m² cada uno.

Iluminación Ambiental:

16hrs de luz por 8 hrs de oscuridad.

Vacunación :

Los pollos fueron vacunados a la primera semana de vida contra la enfermedad de Newcastle por vía ocular 0.03 ml por medio de goteo, y fueron revacunados a la cuarta semana 0.5ml por vía subcutánea con virus vivo cepa Lasota (35).

b.ALIMENTACION

La dieta utilizada para este experimento se muestra en el cuadro 3 y 4.

c.ALUMINOSILICATOS

Los aluminosilicatos empleados en este experimento fueron adquiridos de Arcillas tratadas de México. El porcentaje de inclusión para estos grupos fue de 0.7%

d.PROGRAMA DE RESTRICCIÓN ALIMENTICIA

<u>Edad en días</u>	<u>Acceso al alimento en horas.</u>
1 - 2	<i>ad. libitum.</i> - 24h/día
3 - 21	8am. - 1pm. - 5h/día
22 - 48	8am. - 4pm. - 8h/día
49 - 56	<i>ad. libitum.</i> - 24h/día

e. TRATAMIENTOS

Fueron distribuidos en los siguientes tratamientos, el diseño que fue utilizado se presenta en el cuadro 2.

1. Control (C)
2. Aluminosilicatos 0.7% (A)
3. Restricción (R)
4. Aluminosilicatos 0.7% + Restricción (R+A).

f. PARAMETROS EVALUADOS

- a) Concentraciones de glutatión sanguíneo se obtuvieron de 1 a 2 ml a partir de la vena braquial de cada uno de los pollos.

- b) Parámetros productivos: 1. Consumo de alimento 2. Peso corporal 3. Conversión alimenticia y 4. Mortalidad, a la cuarta y octava semanas de edad.

El peso corporal se obtuvo pesando a los animales por grupo y posteriormente se calculo su promedio, la GP se obtuvo dividiendo el peso de los animales (Kg) entre la edad en días. La CA se obtuvo dividiendo los kg de alimento consumidos durante

el período en estudio, entre el peso corporal del ave kg. La mortalidad se registró diariamente para calcular posteriormente el porcentaje acumulado hasta la octava semana.

Fueron obtenidas doce muestras sanguíneas de la primera semana de edad para calcular la concentración basal de glutatión.

A la cuarta y octava semanas fueron tomadas muestras sanguíneas de doce animales de cada tratamiento.

La sangre se mezcló con 5 unidades de heparina/ml, y se desproteinizó con ácido perclórico 2M + EDTA 4mM en proporción de 1:1 (un ml de sangre por un ml de ácido perclórico).

Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, para calcular la concentración de glutatión a partir del sobrenadante y se cuantificó por el método de Akerboom (1).

Los resultados obtenidos fueron analizados por el Análisis de Varianza y por la prueba de comparación múltiple de Snedecor Newman Keuls en los dos experimentos (51).

III RESULTADOS

3.1 EXPERIMENTO I

No se observó diferencias en la concentración de GSSG durante el período de experimentación entre los tratamientos (Cuadro 5).

Durante la primera semana no se observó diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos en cuanto a las concentraciones de GT y GSH ($\mu\text{mol/ml}$ de sangre) (Cuadro 5).

Durante la cuarta semana los grupos B (50ppb AFB1), D (0.5 % ALS) y E (1.0 % ALS) mostraron mayores concentraciones de GT y GSH ($P > 0.01$), con respecto al resto de los grupos (Cuadro 5).

Durante la octava semana los grupos que recibieron tratamiento con AFB1 o ALS mostraron una disminución de GT y GSH ($P < 0.005$) (Cuadro 5).

Con respecto a la ganancia de peso el grupo control presentó 2.0 kg hasta la octava semana. Los grupos C (300ppb de AFB1), H (300ppb AFB1 + 0.5% ALS) e I (300ppb AFB1 + 1.0% ALS) mostraron una disminución hasta de 790g al compararlos con el grupo control ($P < 0.01$) (Cuadro 6).

Los animales que consumieron aluminosilicatos (ALS) al 0.5% y al 1.0% no presentaron diferencias estadísticas teniendo un peso corporal de 2.14 y 2.0 kg respectivamente (Cuadro 6).

El grupo B (50ppb AFB1) fue similar a los grupos F(50ppb + 0.5 %ALS) y al G(50ppb + 1.0 % ALS) los cuales no mostraron diferencias estadísticas con respecto al grupo control (Cuadro 6).

El consumo de alimento fue menor en los grupos que consumieron 300ppb de AFB1 con o sin ALS (Cuadro 6).

Hallazgos a la necropsia :

No se observaron cambios patológicos aparentes que nos pudieran sugerir un problema de aflatoxicosis. No hubo mortalidad en los nueve tratamientos durante los dos meses que duró el experimento.

3.2. EXPERIMENTO II

El grupo control mantuvo constantes las concentraciones de GT, GSH y GSSG durante el período en estudio (Cuadro 7).

El GSSG permaneció constante en todos los grupos durante las ocho semanas que duró el experimento (Cuadro 7).

Durante la primera semana no se observaron diferencias estadísticas entre los grupos en cuanto a las concentraciones de GT y GSH (Cuadro 7).

Durante la cuarta semana el grupo R+A (restricción alimenticia y ALS al 0.7%) mostró las más elevadas concentraciones de GT y GSH ($P < 0.005$) y los grupos R (Restricción alimenticia sin ALS) y el grupo A (sin Restricción y con ALS al 0.7%) no tuvieron diferencias estadísticas con respecto al control (Cuadro 7).

Durante la octava semana el grupo control y el (R) tuvieron concentraciones constantes de GT y GSH. Los grupos que fueron suplementados con ALS disminuyeron su concentración de GT y GSH ($P < 0.005$) (Cuadro 7).

Únicamente se observaron diferencias estadísticas en cuanto al porcentaje de mortalidad, siendo menor en los grupos sometidos al programa de restricción ($P < 0.01$) (Cuadro 8).

IV DISCUSION

La función protectora contra la aflatoxina B1 (AFB1) del glutatión ha sido descrita por Toshihisa I. (1992), quien menciona que el glutatión reducido (GSH) se conjuga con la AFB1 formando AFB1-2,3, epóxido-GSH y así es eliminada por vía renal e intestinal (44). Para disminuir la disponibilidad de la AFB1 se han utilizado los aluminosilicatos (ALS) los que presentan afinidad por la AFB1, formando enlaces con dicha micotoxina, Phillips y *col.* (1987) reportan una disminución en los efectos nocivos sobre la ganancia de peso al suplementar con 0.5% de ALS el alimento contaminado con 7.5ppm de AFB1.

Sin embargo Deobald reporta que los aluminosilicatos de sodio disminuyen significativamente la ganancia de peso (GP) (25), probablemente debido a que lleguen a ser absorbidas pequeñas cantidades de ALS, Mackenzie (1931), menciona que los ALS disminuyen el fósforo en el hueso (41).

Por otro lado los resultados muestran que las concentraciones de GT y GSH permanecen constantes durante el período en estudio en el grupo control.

Las concentraciones de GSSG permanecen constantes en todos los grupos hasta la octava semana de vida.

Tanto la AFB1 como los ALS disminuyeron las concentraciones de GT y GSH a la octava semana al compararlos con el grupo control.

Los grupos que consumieron 50ppb de AFB1 con o sin ALS no mostraron diferencias estadísticas en cuanto a los parámetros productivos con respecto al grupo control.

En cuanto a la GP los grupos que consumieron 300ppb con o sin ALS mostraron los menores pesos corporales, presentando hasta 790g de diferencia con respecto al control.

Las bajas concentraciones en GSH de los grupos B (50 ppb AFB1) y C (300 ppb AFB1) sugieren que este tripéptido está siendo utilizado en el metabolismo de la AFB1, lo que explica por que los parámetros productivos (conversión alimenticia y la ganancia de peso) no se vieron afectados en el grupo B, Sin embargo el sistema del glutatión no neutraliza la AFB1 a 300 ppb como se observa en el grupo C, en donde obtuvo la menor ganancia de peso (GP), por lo que probablemente el mecanismo de eliminación de el GSH se encuentre saturado o sea ineficiente, probablemente debido a la pérdida de GSH al formar aductos de AFB1-2,3 epóxido-GSH (12). Campbell (1973), señala que la AFB1 no necesita ser metabolizada para iniciar su efecto dañino en el organismo interfiriendo con el transporte de electrones intramitocondriales (8), Gurtoo (1974) señala que la aflatoxina B1 forma

epóxidos que inhiben a la RNA polimerasa nuclear y citoplásmica desarrollando procesos neoplásicos, también descritos por Wogan (1971)(49). Lo que se apoya por los experimentos de Dalvi y Mc Gowan, quienes lograron atenuar los daños por AFB1 (2.5ppm) agregando 0.05% de GSH en el alimento (14).

En cuanto a los grupos que fueron adicionados con ALS para neutralizar a la AFB1, los grupos F(50 ppb AFB1 + 0.5% ALS) y G (50 ppb AFB1 + 1.0% ALS) presentaron concentraciones de glutatión mas elevadas hasta la octava semana pero una menor ganancia de peso con respecto al grupo B, y los grupos H (300 ppb AFB1 + 0.5% ALS) e I (300 ppb AFB1+ 1.0%ALS) mostraron resultados similares en la perdida de peso, pero una mayor concentración de glutatión con respecto al grupo C que podría indicar que los ALS están disminuyendo la disponibilidad de la AFB1, como lo señala Kubena (1989).

En los grupos D (0.5% ALS) y E (1.0% ALS) se observa que los ALS abaten la concentración de GSH por si solos (Cuadro 6), y no mostraron tener un papel protector importante en los grupos con 300 ppb de AFB1, respecto al efecto nocivo de los ALS Storer y Nelson (1968) reportan que las sales de aluminio solubles en agua son quizá una de las causas primarias de mortalidad en pollos (41). Madden observo una relación inversa entre los ALS y la concentración de AFB1 en el hígado afirmando que los aluminosilicatos a bajas concentraciones protegen mejor que a dosis elevadas, resultados que concuerdan con el presente trabajo (28).

Experimento II

Los programas de restricción a edad temprana se han utilizado para disminuir el porcentaje de mortalidad sin tener gran deterioro en la ganancia de peso debido al crecimiento compensatorio (3,5), sin embargo Harisch (1980) reporta que los períodos de ayuno afectan la concentración de GT en hígado de ratón (22).

Los resultados muestran que los grupos que fueron adicionados con ALS tuvieron una disminución en las concentraciones de GT y GSH a la octava semana del experimento ($P < 0.0005$).

El grupo sometido únicamente al programa de restricción y el grupo control mostraron concentraciones constantes de GT y GSH hasta la octava semana del experimento.

En cuanto a los parámetros productivos no hubo diferencia entre los grupos.

El porcentaje de mortalidad disminuyó hasta el 25.98 % en el grupo (R), al compararlo con el grupo control.

El sistema del glutatión se altera en ausencia de glucosa por lo que en estados de ayuno prolongado los radicales libres acentúan su efecto oxidativo sobre las

membranas celulares como lo reporta Andreoli (2). En este estudio el programa de restricción del alimento no tuvo este efecto sobre la parvada.

El efecto nocivo de los ALS sobre las concentraciones de GT probablemente se deba a que estas sales se unan a otros compuestos como el fósforo pues no son selectivas para la AFB1 únicamente, además se ha reportado que afectan la velocidad de crecimiento (16, 25). En el presente trabajo los ALS no afectaron la GP ni la mortalidad. Berger reporta una reducción en la mortalidad del 17.4 % bajo un programa de restricción similar a la utilizada en este estudio.

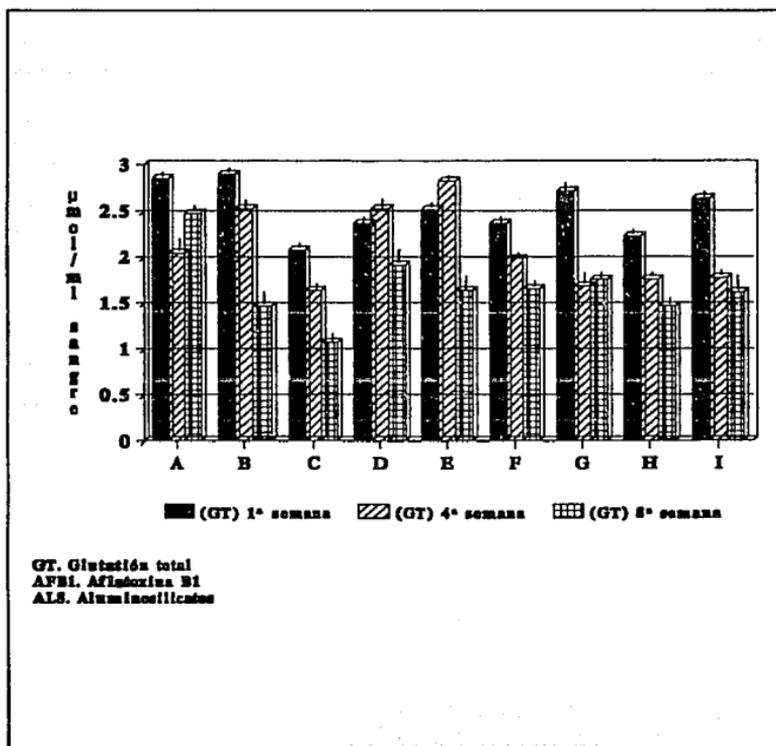
El programa de restricción alimenticia sin ALS mostró los mejores resultados disminuyendo la mortalidad sin afectar las concentraciones de glutatión sanguíneo, se observó un efecto contraproducente con el uso de los ALS en el alimento como ya se ha reportado en estudios anteriores en cuanto a la ganancia de peso (15, 24) aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa en el presente experimento.

Se pudo adaptar la medición del glutatión sanguíneo como prueba bioquímica que permite evaluar a la parvada en cuanto a la capacidad de detoxificación como respuesta del organismo ante los diferentes xenobióticos que fueron administrados a los animales, ya que el glutatión puede ser utilizado como un indicador del daño

producido por los radicales libres que se generan por la ingesta de algunos xenobióticos en donde este tripéptido neutraliza dicha toxicidad al formar ciónjugados para su posterior eliminación (2,6). Haciendo posible detectar alteraciones en el metabolismo antes de observar trastornos en los parámetros productivos.

Figura 1

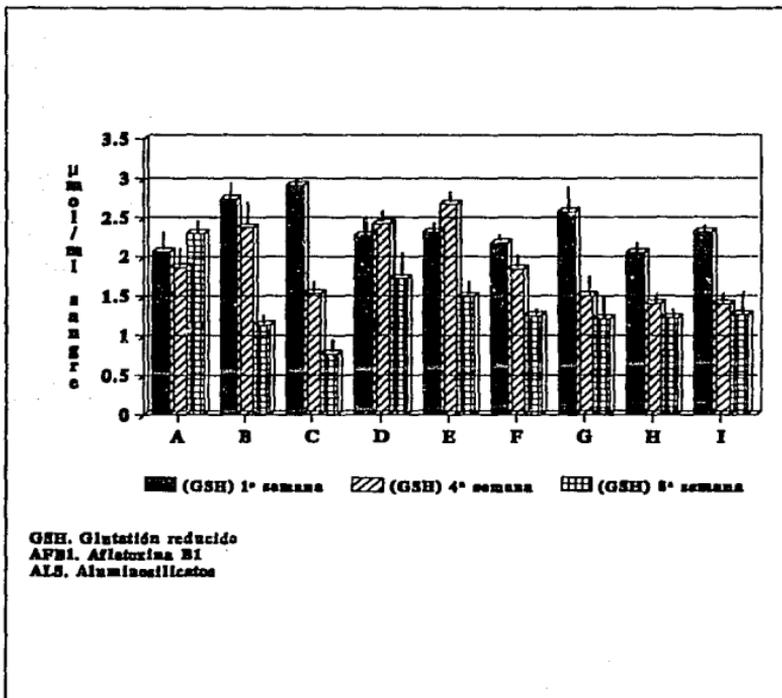
Efecto de la AFB1 y/o de los ALS sobre las concentraciones de GT ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) a la 1^a, 4^a y 8^a semanas de vida del pollo de engorda.



* Ver detalles en el texto.

Figura 2

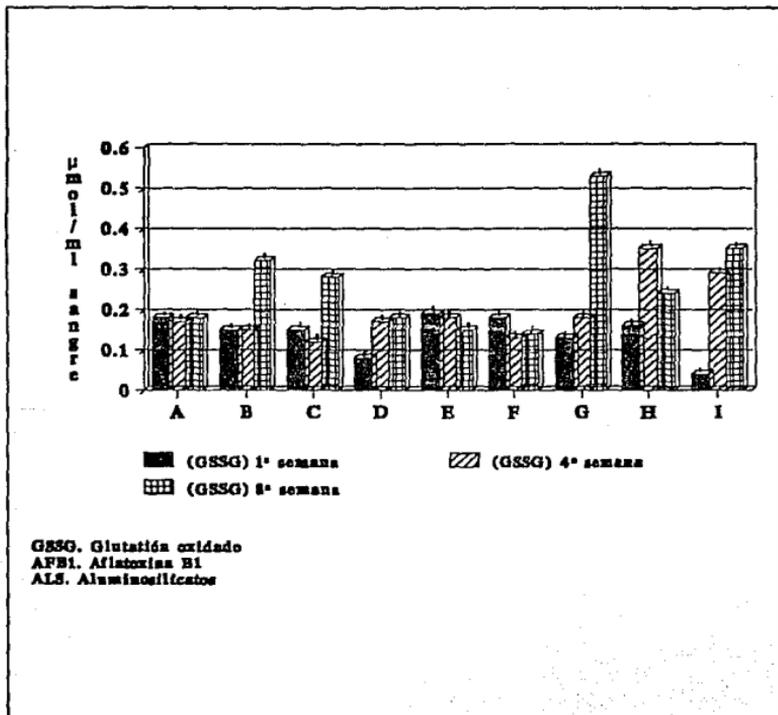
Efecto de la AFB1 y/o de los ALS sobre las concentraciones de GSH ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) a la 1^a, 4^a y 8^a semanas de vida del pollo de engorda.



* Ver detalles en el texto.

Figura 3

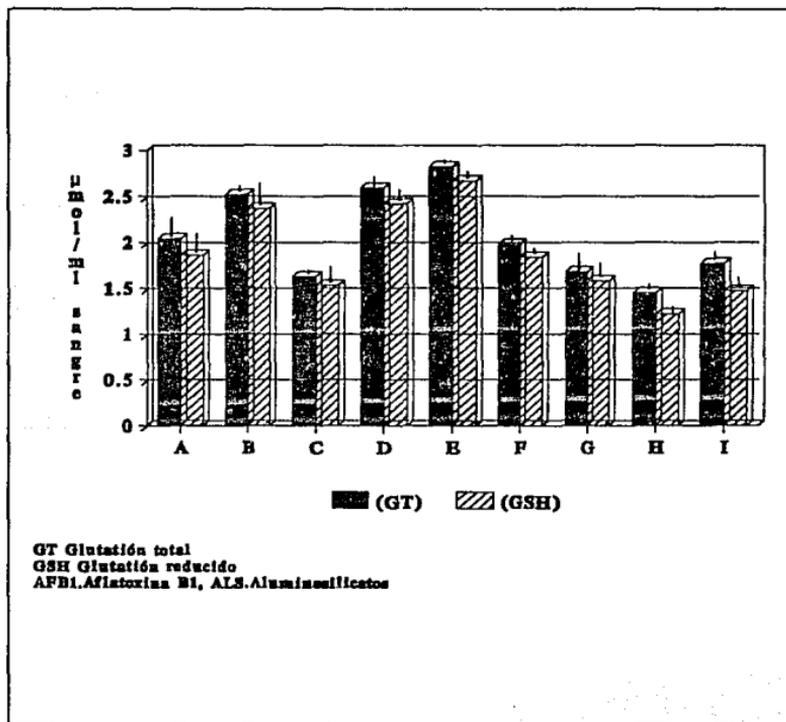
Efecto de la AFB1 y/o de los ALS sobre las concentraciones de GSSG ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) a la 1^a, 4^a y 8^a semanas de vida del pollo de engorda.



* Ver detalles en el texto.

Figura 4

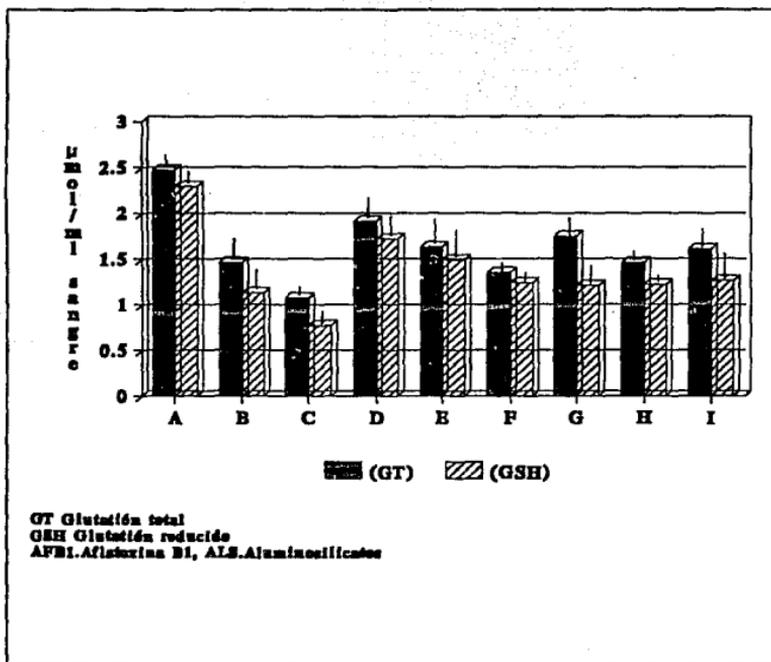
Efecto de la AFB1 y/o de los ALS sobre las concentraciones de GT y GSH ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) a la 4^a semana de vida del pollo de engorda.



* Ver detalles en el texto.

Figura 5

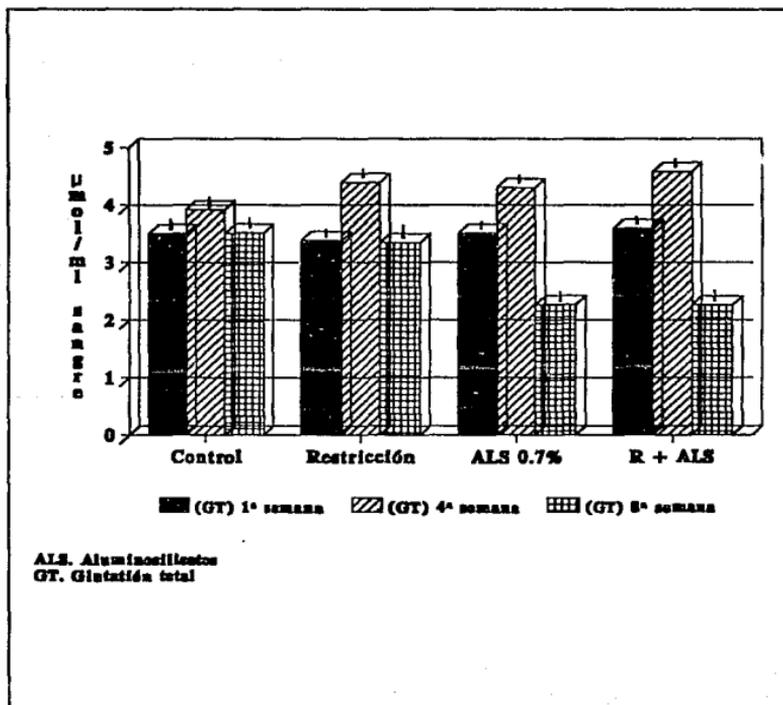
Efecto de la AFB1 y/o de los ALS sobre las concentraciones de GT y GSH ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) a la 8^a semana de vida del pollo de engorda.



* Ver detalles en el texto.

Figura 6

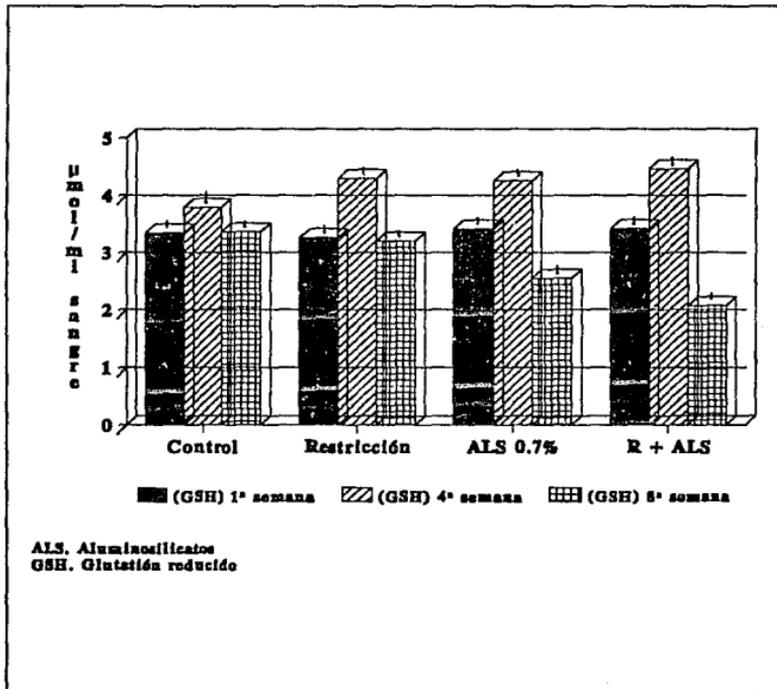
Efecto de la restricción alimenticia y/o de los ALS sobre las concentraciones de GT ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) a la 1^a, 4^a y 8^a semanas de vida del pollo de engorda.



* Ver detalles en el texto.

Figura 7

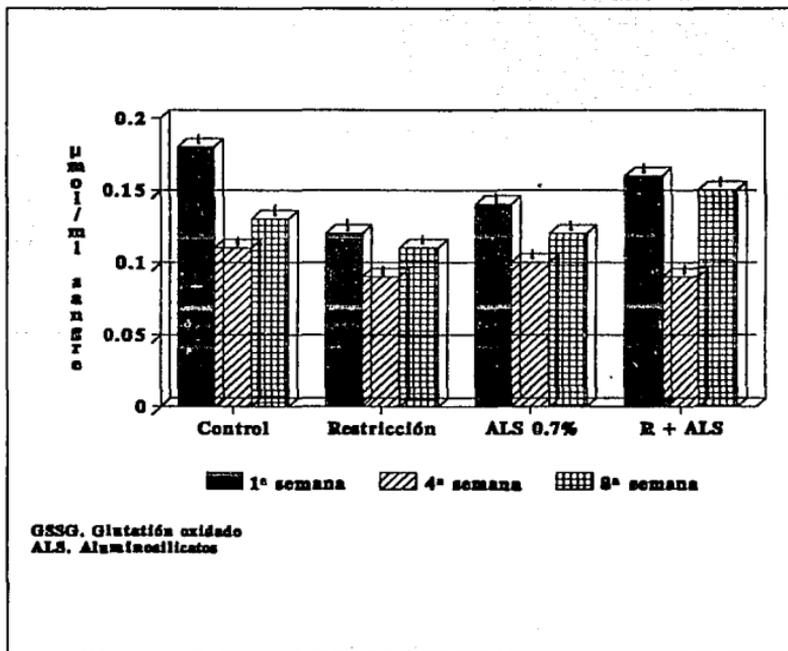
Efecto de la restricción alimenticia y/o de los ALS sobre las concentraciones de GSH ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) a la 1^a, 4^a y 8^a semanas de vida del pollo de engorda.



* Ver detalles en el texto.

Figura 8

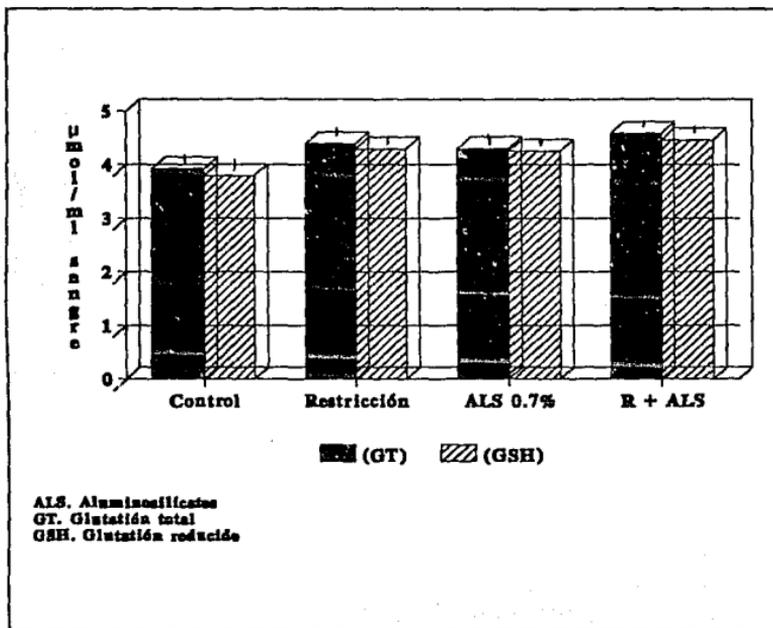
Efecto de la restricción alimenticia y/o de los ALS sobre las concentraciones de GSSG ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) a la 1^a, 4^a y 8^a semanas de vida del pollo de engorda.



* Ver detalles en el texto.

Figura 9

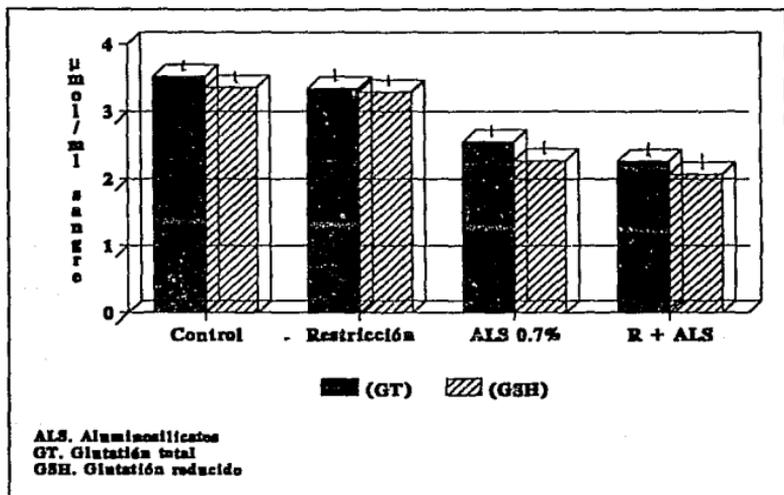
Efecto de la restricción alimenticia y/o de los ALS sobre las concentraciones de GT y GSH ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) a la 4^a semana de vida del pollo de engorda.



▪ Ver detalles en el texto.

Figura 10

Efecto de la restricción alimenticia y/o de los ALS sobre las concentraciones de GT y GSH ($\mu\text{mol/ml} \pm$ error estándar) a la 8ª semana de vida del pollo de engorda.



* Ver detalles en el texto.

CUADRO 1

Diseño Experimental 3x3 factorial con nueve tratamientos, en el que se evaluó el efecto de la AFB1 y los ALS sobre el pollo de engorda (Experimento I).

porcentaje de inclusion en la dieta	ALS 0 %	ALS 0.5 %	ALS 1.0 %
AFB1 0 ppb	A	D	E
n	12	12	12
AFB1 50 ppb	B	F	G
n	6	6	6
AFB1 300 ppb	C	H	I
n	6	6	6
*	12 POLLOS		
N	84 POLLOS		

ALS Aluminosilicatos

AFB1 Aflatoxina B1

n numero de animales en cada grupo

N Población total del experimento.

CUADRO 2

Diseño del experimental 2x2 factorial con cuatro tratamientos en el que se evaluó el efecto del programa de restricción de alimento y de los ALS sobre el pollo de engorda (Experimento II).

	SIN RESTRICCIÓN	CON RESTRICCIÓN
ALS 0%	C	R
n	24	24
ALS 0.7 %	A	R+A
n	24	24
*	12 POLLOS	
N	108 POLLOS	

ALS Aluminosilicatos incluidos en la ración 0 % y 0.7%

n numero de pollos por tratamiento.

* numero de animales utilizados para medir las concentraciones de glutatión basal.

N Población total.

CUADRO 3

Ingredientes y análisis químico proximal del alimento de iniciación para pollo de engorda de la primera a la cuarta semana del experimento II.

MATERIAS PRIMAS	KG/TON
SORGO	530.2
PASTA DE SOYA	371.0
ACEITE VEGETAL	52.0
SAL	3.0
FOSFORO	31.3
CARBONATO DE CALCIO	4.5
L-LISINA HCL	1.6
DL-METIONINA	2.6
PREMEZCLA VITAMINICA	2.50
COLINA 60	0.300
PREMEZCLA DE MINERALES	0.50
SULFATO DE COBRE	0.50
TOTAL	1.0

ANALISIS CALCULADO	APORTE (%)
PROTEINA CRUDA (%)	22
E.M. Kcal-Kg	2900
FIBRA CRUDA (%)	2.65
LISINA	1.42
METIONINA + CISTINA	0.92
TRIPTOFANO	0.31

ANALISIS CALCULADO	APORTE (%)
TREONINA	0.89
ARGININA	1.60
CALCIO	1.05
FOSFORO	0.71

Formulación: MSc. Rocha Hernández A. E.

CUADRO 4

Ingredientes y análisis químico proximal del alimento de finalización para pollo de engorda de la cuarta a la octava semana del experimento II.

MATERIAS PRIMAS	Kg/TON
SORGO	677.2
P. SOYA	265.0
ACEITE	13.0
SAL	3.0
FOSFATO	30.0
LISINA	0.5
METIONINA	1.3
VITAMINAS	2.5
COLINA 25	1.25
MINERALES	2.0
TOTAL	1.000
ANALISIS CALCULADO	APORTE (%)
PROTEINA	18
E.M. Kcal	3000
FIBRA	3.0
LISINA	1.0
METIONA + CISTINA	0.72
TRIPTOFANO	0.18
TREONINA	0.74
ARGININA	1.0
CALCIO	0.90
FOSFORO	0.65

Formulación: MSc. Rocha Hernández A. E.

CUADRO 5

Concentraciones de GT, GSH y GSSG ($\mu\text{mol/ml}$) del pollo de engorda alimentado con AFB1 y ALS, hasta la 8ª semana del experimento I.

EDAD								
1ª semana			4ª semana			8ª semana		
$\mu\text{mol/ml}$ de sangre								
GT	GSH	GSSG	GT	GSH	GSSG	GT	GSH	GSSG
A (Grupo control)								
2.85 a	2.06 a	0.18 a	2.04 a	1.86 a	0.17 a	2.47 a	2.29 a	0.18 a
B (50 ppb AFB1)								
2.80 a	2.73 a	0.15 a	2.52 b	2.37 b	0.15 a	1.46 c	1.13 c	0.32 a
C (300 ppb AFB1)								
2.07 a	2.91 a	0.15 a	1.63 a	1.53 a	0.12 a	1.07c c	0.77. c	0.28 a
D (0.5 % ALS)								
2.36 a	2.27 a	0.08 a	2.59 b	2.42 b	0.17 a	1.91 c	1.72 c	0.18 a
E (1.0 % ALS)								
2.51 a	2.31 a	0.19 a	2.82 b	2.67 b	0.18 a	1.63 c	1.49 c	0.15 a
F (50 ppb AFB1 + 0.5 % ALS)								
2.36 a	2.17 a	0.18 a	1.98 a	1.84 a	0.13 a	1.35 c	1.2 c	0.14 a
G (50 ppb AFB1 + 1.0 % ALS)								
2.71 a	2.57 a	0.13 a	1.68 a	1.50 a	0.18 a	1.75 c	1.21 c	0.53 a

EDAD								
1ª semana			4ª semana			8ª semana		
μmol/ml de sangre								
GT	GSH	GSSG	GT	GSH	GSSG	GT	GSH	GSSG
H (300 ppb AFB1 + 0.5 % ALS)								
2.22 a	2.05 a	0.16 a	1.75 a	1.4 a	0.35 a	1.46 c	1.22 c	0.24 a
I (300 ppb AFB1 + 1.0 %ALS)								
2.36 a	2.31 a	0.04 a	1.77 a	1.47 a	0.29 a	1.61 c	1.26 c	0.35 a

GT Glutación total
 GSH Glutación reducido
 GSSG Glutación oxidado
 AFB1 Aflatoxina B1
 ALS Aluminosilicatos

- a Grupos que no mostraron Diferencia estadística significativa.
- b Grupos que mostraron Diferencia estadística ($P < 0.01$) al compararlos con el grupo control y con respecto a sí mismos .
- c Grupos que mostraron Diferencia estadística significativa ($P < 0.001$) al compararlos con el grupo control y con respecto a sí mismos.

CUADRO 6

Conversión alimenticia, consumo de alimento y ganancia de peso a la 8ª semana en el pollo de engorda sometido a diferentes concentraciones de AFB1 y ALS del experimento I.

GRUPOS	C.A.	Consumo	G.P. (Kg)
A control	2.15	4.31	2.0 a
B 50ppb AFB1	2,15	4,21	1.95 a
C 300ppb AFB1	2.23	2.7	1,21 b
D 0.5% ALS	2.29	4.88	2.14 a

E 1.0%ALS	1.94	5.05	2.0 a
F 50ppb+0.5%	2.27	4.42	1.94 a
G 50ppb+1.0%	2.07	3.7	1.78 a
H 300ppb+0.5%	1.26	2.9	1.28 b
I 300ppb+1.5%	1.78	2.5	1.4 b

CA Conversión alimenticia

GP Ganancia de peso.

AFB1 Aflatoxina B1 50ppb y 300ppb.

ALS Aluminosilicatos al 0.5% y al 1.0%

a Grupos que no mostraron Diferencia estadística significativa.

b Grupos que mostraron diferencia estadística significativa ($P < 0.01$)
al compararlos con el grupo control .

EDAD								
1a. Semana			4a. Semana			8a. Semana		
$\mu\text{mol/ml}$								
GT	GSH	GSSG	GT	GSH	GSSG	GT	GSH	GSSG
R + A (Restriccion + 0.7 % ALS)								
3.59	3.42	0.16	4.58	4.46	0.09	2.26	2.07	0.15
a	a	a	b	b	a	c	c	a

GT Glutación total

GSH Glutación reducido

GSSG Glutación oxidado

ALS Aluminosilicatos

- a Grupos que no mostraron Diferencia estadística significativa.
- b Grupos que mostraron Diferencia estadística significativa ($P < 0.005$) al compararlos con el grupo control y con respecto a sí mismos.
- c Grupos que mostraron Diferencia estadística significativa ($P < 0.0005$) al compararlos con el grupo control y con respecto a sí mismos.

CUADRO 8

Conversión alimenticia, consumo de alimento, ganancia de peso, y % de mortalidad, a la 8ª semana en el pollo de engorda sometido al programa de restricción alimenticia con o sin ALS del experimento II.

TRATAMIENTOS	C.A	Consumo Kg	G.P Kg	M (%)
Control (C)	2.03	5.28	2.6	29.64 a
ALS 0.7% (A)	1.9	4.28	2.5	25.0 a
Restricción (R)	2.15	5.31	2.4	3.22 b
Restricción y ALS 0.7% (R+A)	2.46	5.92	2.4	3.66 b

C.A. Conversión alimenticia
G.P. Ganancia de peso
M Mortalidad por Síndrome Ascítico.
ALS Aluminosilicatos al 0.7%
a Diferencia estadística no significativa
b Diferencia estadística con respecto a l grupo control (P<0.01).

V. LITERATURA CITADA

1. Akerboom, T. P. M.: Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed, disulfide in biological samples. Met. Enzymol., 77: 372-382 (1981).
2. Andreoli, P.S., Mallett, C.P. and Bergstein, J.M.: Role of glutathione in protecting endothelial cells against hydrogen peroxide oxidant injury. J. Lab. Clin. Med., 103: 190-198 (1986).
3. Arce, M.J.Castellanos, G.F. and Berger, M. M.: Control of ascitis syndrome on feed restriction techniques. J. Appl. Poult. Res. 1:1-5 (1992).
4. Ball, C.R.: Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment: relevance to protection against nitrogen mustards. Biochem. Pharmac., 15: 809-816 (1966).
5. Berger, M.M.: La restricción alimenticia y el control del síndrome ascítico en pollo de engorda. II Jornada Médico Avícola, México, D.F., 1991 : 405-420 (1991).
6. Boyland, E. and Chasseaud, L.F.: Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds. Biochem. J., 104: 95-102(1967).

7. Brigelius, R., Muckel, C., Theodorus, P.M., Akerboom, and Sies, H.: Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. Biochem. Pharmac., **32** (17): 2529-2534 (1983).
8. Campbell, C.T. and Hayes J. R.: The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. Toxicol. Appl. Pharmac., **35**: 199-222 (1976).
9. Casaubon, H.M.: Diferentes patogenias del desarrollo del trasudado toraco-abdominal en aves. III Jornada Médico Avícola, México, D.F., 1992: 38-42 Litro da D.F., (1992).
10. Comporti, M., Benedetti, A.: Biology of Disease: Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. Lab. Inv., **53**: 599-623 (1985).
11. Cooper, A.J.L., Pulsinelli, W.A. and Duffy, T.E.: Glutathione and ascorbate during ischemia and postischemic reperfusion in rat brain. J. Neurochem., **35**: 1242-1245 (1980).
12. Chau-Jong, W.; Her-Shyong, S. and Jen-Kun, L.: Effect of ethanol on hepatotoxicity and hepatic DNA-binding of aflatoxin B1 in rats. Bioch. Pharm., **40** : 715-721 (1990).

13. Chung, T.K; Erdman, J.W.: The hydrated calcium aluminosilicates effects on zinc, manganese, vitamin A and riboflavin utilization. Poult. Sci., 69 (8):1364-1370 (1990).
14. Dalvi, R.R., and McGowan, C.: Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chickens by purified aflatoxin B1 and its reversal by activated charcoal, phenobarbital, and reduced glutathione. Poult. Sci., 63: 485-491 (1984).
15. Decad, M.G.; Kathleen, k.d., Hsieh, D.P.H. and Byard, L.J.: Metabolism of aflatoxin B1 in cultured mouse hepatocytes: comparison with rat and effects of cyclohexene oxide and diethyl malate. Toxicol. Appl. Pharmac., 50: 429-436 (1979).
16. Elliot, A.M., and Edwards, J. R.: Some Effects of dietary aluminum and silicon on broiler chickens. Poult.Sci., 70: 1390 - 1402 (1990).
17. Folbergrova, J.: Oxidized and reduced glutathione in the rat brain under normoxic and hipoxic condition. J. Neurochem., 32:1621-1627 (1979).
18. Fujita, T.; Yamamoto, T.; Tabata, M.; Veno, T. and Fujimoto, Y.: The effects of reduced glutathione and cysteine on prostaglandin synthesis in rabbit kidney medulla slices. comp. Biochem. Physiol., 83: 29-31 (1986).

19. Guengerich, F.P.: Similarity of nuclear and microsomal cytochromes P-450 in the activation of aflatoxin B1. Biochem. Pharm., **28**: 2883-2890 (1979).
20. Gurtoo, H.L. and Bejba, N.: Hepatic microsomal mixed functions oxygenase: enzyme multiplicity for the metabolism of carcinogens to DNA-binding metabolites. Biochem. Biophys. Res. Comm., **61** (2): 735-742 (1974).
21. Halliwell, B.: Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB. J., **1**: 358-364 (1987).
22. Harisch, G. and Mahmoud, M.F.: The glutathione status in the liver and cardiac muscle of rats after starvation. Physiol. Chem., **361**: 1859-1862 (1980).
23. Harvey, B.R., Kubena, F.L.: Calcium aluminosilicate in the diets of growing barrows. Am. J. Vet. Res., **50** (3): 416-420 (1989).
24. Hill, K.E. and Burk, R.F.: Effect of selenium deficiency and vitamin E deficiency on glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes. J. Biochem., **83**: 10668-10672 (1982).

25. Hussein, S.A., Cantor, H.A. and Johnson, H.T.: Comparison of the use of dietary aluminum with the use of feed restriction for force-molting laying hens. Poul. Sci., 68: 891-896 (1989).
26. Kosower, N.S.: The glutathione status of cells. Inter. Rev. Cytol. Academic Press, inc., 54: 109-153 (1978).
27. Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Corrier, D.E. and Huff, W.E.: Disimintion of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary additiión of hydrated, sodium calcium aluminosilicate. Poult. Sci., 69: 727-735 (1990).
28. Madden, A.V. and Henry, M.S.:Effect of soil on aflatoxin tissue retention in chichs when added to aflatoxin-contaminated poultry rations. Vet. Hum. Toxicol., 34 (6): 521-523 (1992).
29. Mallery, S.R. and Laufman, H. B.:Association of cellular thiol redox status with mitogen-induced calcium metabolization and cell cycle progression in human fibroblasts. J. Cell. Biochem., 45:82-92 (1991).
30. Meredith, J. M.; Reed, D.J.: Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocytes. : J. Biol. Chem., 257 (7) : 3747-3753 (1982).

31. Panfili, E., Sandri, G. and Ernster, L.: Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. FEBS., 290: 35-37 (1991).
32. Perez, R., Lopez, M. and Barja, de Quiroga, G.: Aging and lung antioxidant enzymes, glutathione, and lipid peroxidation in the rat. Free Rad. Biol. & Med., 10: 35-39 (1991).
33. Phillips, D.T.: Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. Poult. Sci., 67: 243-247 (1988).
34. Purwoko, H. M. and Hald, B.: Aflatoxin content and number of fungi in poultry feed stuffs from Indonesia. Appl. Microbiol., 12 (6) : 212-215 (1991).
35. Quintana, L.J.A.: Avitécnia 1a. ed. Trillas, México. D., F. 1988.
36. Reed, D.J., Balson, J.R., Beatty, P.W., Brodie, A.E., Ellis, W.W., and Potter, D.W.: High-performance liquid chromatography analysis of nanograms levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols, and disulfides. Anal. Biochem., 106: 55-62 (1980).
37. Richie, J.P. and Lang, C.A.: The determination of glutathione, cysteine, and other thiols and disulfides in biological samples using high-performance liquid

- chromatography with dual electrochemical detection. Anal. Biochem., **163**: 9-15 (1987).
38. Sarby, T.F.: Hongos y micotoxinas: Un problema del hombre y los animales. Suplemento Dawe's. **297**: 1160-1164 (1977).
39. Sies, H, Brigelius, R. and Graf, P.: Hormones, glutathione status and protein S-thiolation. Adv. Enz. Reg., **26**: 175-189 (1986).
40. Southorn, P. A.: Free radicals in medicine. I. chemical nature and biological reactions. Clin. Proc. Dep. Anesthesiol. **63**: 381-389 (1988).
41. Srivastava, K.S. and Beutler, E.: The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes. J. Biol. Chem. **244** (1): 9-16 (1969).
42. Storer, N.L., Nelson, T.S.: The effect of various aluminium compounds on chick performance. Poult. Sci., **47**: 244- 247 (1968).
43. Summers, J. D., Startt, D.: Restricted feeding and compensatory growth for broiler. Poult. Sci., **69**: 1855-1861 (1990).

44. Tietze, F.: Enzymatic Method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal. Biochem., 27: 502-522 (1969).
45. Toshihisa I.: The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. TIBS, 17: 463-468 (1992).
46. Ueno, Y.: The Toxicology of mycotoxins. Crit. Rev. Toxicol., 14: 99-100 (1985).
47. Uzel, N., Sivas, A. Uysal M. and Oz, H.: Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. Horm. Metabol. Res., 19: 89-90 (1987).
48. Valladares, de la C. J. C.: Tesis de maestria: Facultad de Med. Vet. y Zoot. Cuautitlan Izcalli, 1992.
49. Williamsión, J.M., Boettcher, B. and Meister, A.: Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione syntesis. Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 6246-6247 (1982).

50. Wogan, G.N. and Shank, R.C.: Toxicity and carcinogenicity of aflatoxins. Adv. Envir. Sci. Tecnol., **2**: 321-351 (1971).
51. Zar, J.H.: Biostatistical Analysis. 5th ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliff, N.J. 1974.
52. Ziegler, D.M.: Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. Ann. Rev. Biochem., **54** :305-329 (1985).