

01694



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DE LA SOYA CRUDA INTEGRAL Y SU LECTINA (SBA)
EN EL TUBO DIGESTIVO, EN LA NUTRICION Y LA
PIGMENTACION DEL POLLO DE ENGORDA**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

MARIA TERESA CASAUBON HUGUENIN

TUTOR: DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA.

COMITE TUTORAL: DR. ERNESTO AVILA GONZALEZ,
DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ, DRA. IRMA TEJADA
CASTAÑEDA Y DR. ALVARO AGUILAR SETIEN.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DECLARACIÓN

El autor autoriza a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotécnico.



María Teresa Casaubon Huguenin

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: María Teresa Casaubon Huguenin

FECHA: 13 Oct 2004

FIRMA: 

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo:

A mi mamá Thérèse Huguenin Chenu que en paz descansa y a mi papá Lucien Casaubon Berthoud quienes me forjaron física, moral, emocional y culturalmente para lograr ser feliz.

A mis hijos Roberto, Eduardo, Adriana y a Rogelio Rocha Menchaca que con entereza y amor han compartido conmigo los buenos y malos momentos dándome el apoyo que he necesitado.

A mi prima Fabienne Lesgourgues y a mi hermana Blanca Guadalupe Avendaño Buguete por haber creído en mí y haberme impulsado y sostenido con amor, decisión y dedicación para lograr superar los momentos más difíciles y dolorosos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer ante todo a Dios nuestro señor por haberme dado la oportunidad de vivir para seguir el camino que me marcó junto a una familia ejemplar y rodeada de gran cantidad de amigos y compañeros que siempre me brindaron amor.

El más sincero agradecimiento para mi Maestra la Dra. Aline Schuneman de Aluja que con su ejemplo, paciencia y comprensión me formó para servir a mi patria. Al Dr. José Antonio Quintana que creyó en mí y me ofreció su amistad incondicional en el momento crucial para mi desarrollo personal, profesional y académico.

También tengo muy presente en mi corazón y agradezco particularmente al Dr. Ernesto Ávila, al Dr. Carlos López Coello, al Dr. Tamas Fehervari y al Dr. Edagar Zenteno por su amistad, calidad humana, consejos y enseñanzas.

En este espacio ofrezco un sincero agradecimiento para todas aquellas personas que colaboraron eficaz e incondicionalmente con su esfuerzo para llevar a cabo este trabajo: Francisco Trigo Tavera, Rosario Ramos, QBF Delia Arlette Castillo Mata, QBF Rosalba Salcedo Elisea, MVZ, MS Daniel Atilano López, MVZ. MS Rene Morales, T. Guillermo Salazar, el MVZ Gerardo López Buendía, MVZ Abril Mendoza, Dr. Carlos Vázquez, Dr. Ricardo Lascurain, Dra. Irma Tejada, MVZ Raul Cortés Coronado.

Doy las gracias a todos mis compañeros y amigos y a todos los miembros del Centro de cómputo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por el apoyo invaluable que me han brindado en todo momento.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, al Departamento de Producción Animal: Aves y a la División de Estudios de Posgrado e Investigación que contribuyeron en toda mi formación y superación académica que culmina con los estudios de Doctorado.

Trabajo realizado en las instalaciones del Departamento de Producción Animal: aves y del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología el haberme aceptada en el Programa de Becas-Crédito CONACYT para Estudios de Posgrado con número de registro 129279 lo cual fue determinante para lograr la obtención del grado de Doctor en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

El financiamiento indispensable para el desarrollo del presente estudio fue otorgado por el "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica" (PAPIIT - IN216398).

INDICE

DECLARACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE	v
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I.- INTRODUCCIÓN DEL PROYECTO	
<i>Definición y procedencia de las lectinas.</i>	3
<i>Función de las lectinas en las plantas.</i>	5
<i>Efecto patógeno de las lectinas en animales</i>	6
<i>Patogenia del efecto antinutricional de las lectinas.</i>	7
<i>Características generales de la harina de soya (Glycine max).</i>	9
<i>Características químicas y propiedades de la lectina de soya (SBA)</i>	9
<i>Historia del empleo de la soya</i>	10
<i>Productos de soya en el mercado</i>	10
II.- JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	11
III.- HIPÓTESIS DEL PROYECTO	13
IV.- OBJETIVOS DEL PROYECTO	13
V.- MATERIALES Y MÉTODO DEL PROYECTO	
<i>Diseño experimental</i>	14
<i>Alojamiento y manejo</i>	14
<i>Propiedades de las harinas de soya utilizadas</i>	15
a) Determinación de la actividad ureásica en PSD y SCI.	15
b) Obtención de extractos salinos a partir las dietas y las harinas de soya.	16
c) Determinación de la actividad hemaglutinante de la SBA en la PSD y la SCI.	16
d) Determinación de la concentración de SBA en las dietas y en las soyas utilizadas	16
<i>Metodología para el análisis de resultados.</i>	17
LITERATURA CITADA	18

VI.- EFECTO DE LA SCI Y DE LA SBA QUE ESTA CONTIENE, EN LOS TEJIDOS DEL TUBO DIGESTIVO DEL POLLO DE ENGORDA.	
INTRODUCCIÓN	28
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	
<i>Histología.</i>	31
<i>Microscopia electrónica.</i>	32
<i>Análisis estadístico.</i>	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
<i>Análisis de proventrículo y molleja.</i>	33
<i>Análisis de duodeno e intestino medio.</i>	35
<i>Microscopia electrónica de duodeno y páncreas.</i>	35
CONCLUSIONES	39
LITERATURA CITADA	39
VII.- INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-SBA EN INTERACCIÓN CON EL EPITELIO INTESTINAL DEL POLLO DE ENGORDA.	
INTRODUCCIÓN	59
HIPÓTESIS	61
OBJETIVO	61
MATERIAL Y MÉTODOS	61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	64
LITERATURA CITADA	64
VIII.- EFECTO DE LA SOYA CRUDA INTEGRAL (SCI) EN LOS PROCESOS DE DIGESTIÓN / ABSORCIÓN Y DE PIGMENTACIÓN EN EL POLLO DE ENGORDA	
INTRODUCCIÓN	67
<i>Aspecto de las excretas.</i>	67
<i>Parámetros productivos.</i>	70
<i>Relación consumo agua/ alimento.</i>	70
<i>Análisis químico de las excretas y concentración sérica de ácido úrico.</i>	70
<i>Concentración sérica de xantofilas y pigmentación cutánea.</i>	71

HIPOTESIS	74
OBJETIVOS	75
MATERIAL Y MÉTODOS	
<i>Aspecto de las excretas.</i>	75
<i>Parámetros productivos.</i>	75
<i>Relación consumo agua/ alimento.</i>	75
<i>Análisis químico de las excretas y concentración sérica de ácido úrico.</i>	75
<i>Concentración sérica de xantofilas y pigmentación cutánea.</i>	76
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
<i>Aspecto de las excreta.</i>	77
<i>Parámetros productivos.</i>	77
<i>Relación consumo agua/ alimento.</i>	78
<i>Análisis químico de las excretas y concentración sérica de ácido úrico.</i>	78
<i>Concentración sérica de xantofilas y pigmentación cutánea.</i>	80
CONCLUSIONES	81
LITERATURA CITA	82
IX.- CONCLUSIONES DEL PROYECTO	93
X.- PROSPECTIVAS	94

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Composición de las dietas para iniciación y finalización (g / kg).	25
Cuadro 2.	Análisis calculado de nutrientes principales (g / kg) en las dietas para iniciación y finalización.	26
Cuadro 3.	Criterios para severidad de lesiones microscópicas consideradas en proventrículo.	43
Cuadro 4.	Criterios para severidad de lesiones microscópicas consideradas en duodeno e intestino medio.	44
Cuadro 5.	Criterios de lesiones microscópicas consideradas en páncreas.	45
Cuadro 6.	Lesiones macroscópicas gastroentéricas de pollos de engorda de 42 días de edad (porcentaje de presentación por tratamiento).	46
Cuadro 7.	Severidad media por tratamiento de lesiones microscópicas de proventrículo de pollos de engorda de 42 días de edad (medias por tratamiento).	47
Cuadro 8.	Severidad de las lesiones microscópicas en mucosa de duodeno de pollos de engorda de 42 días de edad (medias por tratamiento).	48
Cuadro 9.	Severidad de las lesiones microscópicas en mucosa de intestino medio de pollos de engorda de 42 días de edad (medias por tratamiento).	49
Cuadro 10.	Lesiones microscópicas de todo el intestino de pollos de engorda de 42 días de edad, que mostraron diferencias (medias por tratamiento).	50
Cuadro 11.	Medias de cantidad de mitosis por cripta y largo de vellosidades en duodeno e intestino medio de pollos de 42 días de edad.	51
Cuadro 12.	Cuadrados medios de cantidad de mitosis por cripta y largo de vellosidades en duodeno e intestino medio de pollos de 42 días de edad.	52
Cuadro 13.	Severidad de las lesiones microscópicas de páncreas de pollos de engorda de 42 días de edad.	53
Cuadro 14.	Procedimientos para el control de reactivos.	65

Cuadro 15. Media \pm error estandar de los parámetros productivos (g) y de la concentración sérica de ácido úrico (mmol/l) de pollos de engorda de 42 días de edad.	87
Cuadro 16. Cuadrados medios de los parámetros productivos (g/kg) y de la concentración sérica de ácido úrico (mmol/l) de pollos de engorda de 42 días de edad.	88
Cuadro 17. Medias \pm error estandar de la relación de los consumos de agua y alimento (ml/g) del día 35 y el 42 de edad y del análisis químico de excretas (g/kg) de pollos de engorda de 38 días de edad.	89
Cuadro 18. Cuadrados medios de la relación de los consumos de agua y alimento (ml/g) del día 35 y el 42 de edad y del análisis químico de excretas (g/kg) de pollos de engorda de 38 días de edad.	90
Cuadro 19. Medias de consumo total de pigmento (mg) por pollo, del área cutánea, de la densidad óptica de la concentración sérica de xantofilas y de la pigmentación cutánea (escala CIE Lab.) a los 42 días de edad	91

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1	A.-Papilas normales del proventrículo; B.- Ausencia de papilas.	54
Fig. 2	Mucosa normal de proventrículo.	54
Fig. 3	Atrofia e infiltración leucocitaria severa de la mucosa del proventrículo, que denota inflamación.	54
Fig. 4	Meato glandular de proventrículo parcialmente obstruido por infiltración linfoide severa e hiperplasia del epitelio.	54
Fig. 5	Conducto entre molleja y duodeno (A) normal; (B) dilatación moderada; (C) dilatación severa.	54
Fig. 6	Erosión severa y úlceras en la capa de koilin de la molleja de un pollo con 0% de SCI en la dieta.	55
Fig. 7	Hiperplasia severa del epitelio que le da el aspecto de rama de helecho a la vellosidad de intestino medio.	55
Fig. 8	Hiperplasia y SBA en citoplasma pero no en microvellosidades.	55
Fig. 9	Atrofia severa de vellosidades de intestino medio.	55
Fig. 10	Atrofia severa de vellosidades de intestino medio con displasia del epitelio.	55
Fig. 11	Descamación normal en ápice de vellosidad de intestinal.	55
Fig. 12	Displasia en ápice de vellosidad.	56
Fig. 13	Hiperplasia severa en cripta de duodeno.	56
Fig. 14	Descamación celular normal en ápice de vellosidad.	56
Fig. 15	Destrucción y desorganización extensa de las microvellosidades de los enterocitos en proceso de descamación normal en el ápice de la vellosidad.	56
Fig. 16	Mitocondrias hinchadas con lisis de la matriz y de las crestas y presencia de gránulos electro densos.	56
Fig. 17	Morfología normal de microvellosidades en su porción basal.	56
Fig. 18	Hipertrofia nodular de páncreas con 80% de SCI en la dieta y 3 196 µg de SBA por gramo de alimento.	57
Fig. 19	SBA en citoplasma de enterocitos.	57
Fig. 20	SBA en microvellosidades.	57
Fig. 21	Escasa SBA en islotes A (glucagón); abundante SBA en islote B (insulina) y ausencia de SBA en parénquima exocrino de páncreas.	57

ABREVIATURAS

- 21SCI** Aves alimentadas durante 21 días con una dieta a base de soya cruda integral y sorgo de las cuales fueron obtenidos cortes de duodeno e intestino medio como testigos positivos en la prueba de inmunohistoquímica.
- AC** Aves alimentadas durante 21 días con alimento comercial (a base de pasta de soya desgrasada y sorgo) de las cuales fueron obtenidos cortes de duodeno e intestino medio como testigos negativos en la prueba de inmunohistoquímica.
- ACA** Aves alimentadas durante 21 días con alimento comercial (a base de pasta de soya desgrasada y sorgo) sometido a autoclave durante una hora a 42 libras de presión, de las cuales fueron obtenidos cortes de duodeno e intestino medio como testigos negativos en la prueba de inmunohistoquímica.
- AdoMetDC** S-adenosilmetionina decarboxilasa. Enzima que descarboxila la putresina dando origen a la espermidina que a su vez es descarboxilada por esta misma enzima dando origen a la espermita. Esta enzima es degradada por la acción de la 26S proteosoma.
- AEC** Amino-etil-carbazol.
- CCK** Colecistoquinina. Hormona que en aves, se origina en la primera porción del intestino. La CCK es agonista de la gastrina y junto con la secretina estimulan la secreción tanto de H^+ como de pepsina.
- DAB** Diamino bencidina.
- EE** Extracto etéreo.
- GalNAc/Gal** N-acetil D-galactosamina y galactosa.
- LEL** *Lycopersicon esculentum* (por sus siglas en inglés) o lectina del tomate.
- LPS** Liposacáridos.
- NNP** Nitrógeno no protéico.
- ODC** Ornitin decarboxilasa. Enzima que descarboxila la ornitina dando lugar a la putresina. Esta enzima es degradada por la acción de la 26S proteosoma.
- PC** Proteína cruda.
- PHA** *Phaseolus agglutinin* (por sus siglas en inglés) o Lectina del frijol *Phaseolus vulgaris*.
- PNA** Polisacáridos no almidáceos.
- PPA** Polipéptido pancreático aviar.
- PSD** Pasta de soya desgrasada.

- PV** Proteína verdadera.
- SAU** Valores séricos de ácido úrico.
- SBA** Soybean agglutinin (por sus siglas en inglés) o Lectina de soya.
- SCI** Soya cruda integral.
- SSAT** Espermidin/espermita N¹-acetiltransferasa. Enzima que interviene en la catalisis de las poliaminas. Esta enzima es degradada por la acción de la 26S proteosoma.
- STR** Síndrome de tránsito rápido.

EFFECTOS DE LA SOYA CRUDA Y SU LECTINA (SBA) EN EL TUBO DIGESTIVO, EN LA NUTRICIÓN Y LA PIGMENTACIÓN DEL POLLO DE ENGORDA

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la soya cruda integral (SCI) en la absorción/digestión en el pollo de engorda y evaluar el papel de su lectina o hemaglutinina de soya, (SBA por sus siglas en inglés) en la patogenia del síndrome de tránsito rápido (STR) del pollo de engorda. Seis grupos de pollos de engorda fueron alimentados durante 42 días, con seis dietas experimentales en las que fue sustituida la proteína de la pasta de soya desgrasada (PSD) de la dieta basal por porcentajes crecientes entre 0 y 100%, de proteína de la SCI. Los resultados obtenidos sugieren que la SBA incluida en la SCI puede jugar un papel en la patogenia del STR ya que la interacción e incorporación de la SBA en los enterocitos estuvo asociada a hiperplasia y displasia del epitelio intestinal evidenciadas por el incremento progresivo ($P \leq 0.001$) de mitosis/cripta así como por atrofia de las vellosidades en el duodeno e intestino medio. Las microvellosidades de los enterocitos del duodeno, no presentaron alteraciones ultraestructurales, pero las mitocondrias estuvieron tumefactas y el retículo endoplásmico fragmentado y con vacuolas. Las heces en las dietas con 0% y 20% de proteína de SCI fueron más acuosas y desmoronadas mientras que las originadas por las dietas con más de 40% de proteína de SCI presentaron más moco. Por cada 20% de proteína de PSD sustituido por proteína de SCI, la relación consumo de agua/alimento disminuyó 19% con un efecto cuadrático ($P \leq 0.001$). A los 42 días, la indigestión y mala absorción de proteína indujo disminución progresiva de la ganancia de peso ($P \leq 0.001$) hasta ser 50% menor con la dieta 100% de proteína de SCI. La concentración de ácido úrico disminuyó 58.2 mmol/l hasta que fue sustituido el 60% de proteína de PSD. A partir de este porcentaje de inclusión de proteína de SCI, el ácido úrico aumentó pero sin rebasar el nivel normal en aves. A medida que el porcentaje de proteína de SCI en la dieta fue mayor, la cantidad de xantofilas en el suero y el amarillamiento de la piel, aumentó en forma lineal. El incremento de la absorción de xantofilas y la disminución de la absorción de proteínas pudo ser causado por las lesiones provocadas por la interacción de la SBA con los receptores de las microvellosidades y su incorporación al citoplasma del epitelio intestinal.

ABSTRACT

This study was aimed at determining the effect of raw full-fat soybean (RFFS) in the digestion/absorption of broilers and to evaluate the role of soybean agglutinin (SBA) in the pathogenesis of the feed passage syndrome of broilers. Six broilers groups were fed with six experimental diets for 42 days in which the defatted soybean meal (DSM) of the basal diet was substituted with increasing RFFS protein percentages ranging from 0 to 100%. Results suggested that SBA included in the RFFS can play a role in the pathogenesis of the feed passage syndrome in broilers since binding and incorporation of SBA to enterocytes were associated to hyperplasia and dysplasia of the intestinal epithelium, as suggested by the progressive increases ($P<0.001$) of mitosis/crypt in the duodenum and in the mid-intestine, as well as by intestinal villi atrophy ($P<0.001$) in the duodenum and the mid-intestine. There were no ultra structural disorders in duodenal enterocytes microvillitis, but the mitochondrias were swelling and fragmented and the reticulum with vacuoles. The most watery and crumbly feces were observed for the 0% and 20% RFFS diets while the orange mucus was evident only when RFFS protein inclusion reached more of 40% in the diet. For every 20% of DSM protein substituted by RFFS protein, the water/food intake ratio decreased 19% with quadratic effect ($P\leq 0.001$). Indigestion and malabsorption of proteins induced progressive low weight gain ($P<0.001$) up to 50% with 100% of RFFS protein in the diet at 42 days. The serum uric acid concentration decreased 58.2 mmol / l up to the 60% level of DSM protein substitution. From that point, it increased but did not exceed the normal level found in birds. Xanthophylls in serum and skin yellowness were enhanced linearly in the broilers fed 42 days with increasing percentages of RFFS protein in the diet. Increased xanthophylls absorption and decreased protein absorption can be caused by pathological changes in the epithelial intestine triggered by SBA binding and incorporation at the cytoplasm.

I.- INTRODUCCIÓN GENERAL

El objetivo del presente estudio fue determinar si los niveles residuales de la lectina o hemaglutinina de la soya conocida como SBA (por sus siglas en inglés), presentes en la pasta de soya desgrasada comercial (PSD), juegan un papel en la patogénesis del padecimiento del pollo de engorda conocido en Latinoamérica como, síndrome de paso de alimento o Síndrome de tránsito rápido (STR) (**Reyes y col.**, 1998; **Fehérvári**, 1998; **Nilipour y Butcher**, 1996; **Maenz y col.**, 1999). Si la SBA provoca en pollos de engorda alteraciones intestinales, aún en concentraciones pequeñas, pudiera jugar algún papel en la patogénesis del STR. El STR es una enfermedad de los pollos de engorda también conocida como síndrome de enanismo y retraso, síndrome de mala absorción y síndrome de pollos pálidos entre otros por los signos y lesiones que la caracterizan pero cuya etiología no ha sido aún determinada plenamente (**Nilipour y Butcher**, 1996). El STR origina cuantiosas pérdidas económicas para la industria avícola mundial por provocar baja ganancia de peso, reducida eficiencia de la conversión alimenticia debido a daño intestinal que causa indigestión y mala absorción de proteínas y otros nutrientes y por cursar con excreción de excesiva cantidad de líquido que propicia el desarrollo de coccidiosis (**Reyes y col.**, 1998 y **Songserm y col.**, 2000). Los factores antinutricionales de la soya cruda integral (SCI) en aves, han sido estudiados principalmente con respecto a su efecto en la ganancia de peso y otros parámetros productivos. El efecto perjudicial de la SCI fue atribuido a las lesiones y alteraciones fisiológicas provocadas en páncreas, por las dos antitripsinas y no por el de la SBA que contiene la soya. (**Coates y Hewitt** 1970; **Nitsan y Nir**, 1977; **Applegarth y col.**, 1964; **Bielorai y col.**, 1977; **Noy y Sklain**, 1995).

Definición de lectinas

Las lectinas son proteínas de origen no inmune capaces de interactuar específica y reversiblemente con azúcares de glicoconjugados, sin alterar la estructura covalente de ninguno de los glicosídicos que reconoce (**Grant**, 1999). Estas proteínas se encuentran en una gran variedad de semillas y raíces de plantas, hongos, bacterias, virus, parásitos, algas marinas, esponjas, moluscos, huevos de peces, fluidos corporales de invertebrados y de vertebrados inferiores. En mamíferos, las lectinas intervienen en una gran cantidad de procesos biológicos tales como infección, identificación de glicoproteínas de membranas

celular, fertilización, metástasis de cáncer, crecimiento y diferenciación tisular (**Loris y col.**, 1998; **Pusztai**, 1991; **Van Damme y col.**, 1998).

En los extractos de granos maduros, las lectinas constituyen hasta el 10% del nitrógeno total (**Aoyama y col.**, 2001). Las lectinas según su procedencia, poseen características estructurales y de especificidad por carbohidratos en común; son proteínas que poseen una estructura terciaria semejante y al menos un dominio para interactuar específicamente con su receptor sacarídico. Las lectinas no poseen actividad catalítica; interactúan mediante enlaces de hidrógeno, coordinaciones metálicas, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals entre otros, con receptores específicos oligosacarídicos o glicopéptidos de bacterias, virus, parásitos, mucina y membranas celulares de animales (**Aoyama y col.**, 2001).

Las lectinas pueden ser agrupadas 5 categorías con base en el tipo de carbohidratos con los que interactúan específicamente; manosa/glucosa (Man/Glc), galactosa/N-acetil-galactosamina (Gal/GalNAc), N-acetil-glucosamina (GlcNAc), fucosa y N-acetil-ácido neuramínico (**Pusztai**, 1991; **Van Damme y col.**, 1998; **Manoj y Suguna**, 2001). Son varias las lectinas que interactúan con un mismo tipo de carbohidrato, sin embargo esta interacción es específica y diferente para cada lectina según la secuencia y estructura tridimensional que presenta cada carbohidrato (**Goldstein y col.**, 1986).

En modelos experimentales ha sido demostrado que diversas lectinas vegetales interactúan especialmente con los carbohidratos que se encuentran en la superficie de las microvellosidades de los enterocitos (**Pusztai**, 1991; **Vijayan y Chandra**, 1999). Algunas lectinas son polivalentes e interactúan con moléculas hidrofóbicas tales como adenina y sus derivados, así como con citocinas reguladoras del crecimiento de las plantas (**Hirsch**, 1999). Debido a su gran especificidad, las lectinas han sido empleadas para caracterizar la estructura y organización de glicoconjugados presentes en la superficie de células normales, e identificar los cambios que estos sufren durante la diferenciación y transformación celular durante la ontogenia o como resultado de una transformación maligna (**Entzian y col.**, 1988 y **Mody y col.**, 1995).

Las lectinas son detectadas generalmente a través de la actividad hemaglutinante que presentan (**Grant**, 1991). Esta propiedad, ha sido considerada como la manifestación detectable de la integridad funcional de una lectina. Sin embargo, la hemaglutinación es un fenómeno complejo y muy específico, que se lleva a cabo solo si las propiedades químicas y

secuencia de los azúcares que constituyen los glicoconjugados de la membrana plasmática de los eritrocitos utilizados, corresponden a los de la lectina. Por ejemplo, la SBA solo aglutina eritrocitos de conejo y del grupo A de humano (Sharon y col., 1972 y Pusztai y col., 1990). A numerosas lectinas, se les ha reconocido también actividad mitogénica, por lo que han sido utilizadas como una herramienta útil en cultivo de células. La Concanavalina A de *Canavalia ensiformis* es la más ampliamente utilizada con este fin. (Morgan y Darling, 1993; Reyes y col., 1998; Pusztai, 1991).

Las lectinas son resistentes a la degradación proteolítica. Baintner (1993) detectó la lectina de soya en el duodeno de ovinos después de una hora y en el yeyuno hasta 24 horas después de haberla ingerido. Así mismo, Pusztai y col. (1988) pudieron detectar en el contenido intestinal de ratas, el 90% de la lectina de *Phaseolus vulgaris* que se les había suministrado. Igualmente, Calderón de la Barca y col. (1987) determinaron la actividad hemaglutinante de la lectina de *Amaranthus cruentus* en las excretas de rata, lo cual sugiere que esta lectina aparentemente no sufrió ninguna alteración en su paso por el tubo digestivo.

Las lectinas son termosensibles. Fasina y col. (1999), señalaron que la concentración de lectina de la PSD disminuye en forma exponencial, a medida que se incrementa el tiempo y la temperatura de cocción en autoclave, lográndose desnaturalizar más del 90% de este compuesto, después de 5 minutos a 100 °C. El cocimiento recomendado es de 15 libras de presión por pulgada² de vapor durante 20 a 30 minutos, pero si perdura durante 60 o 90 minutos, el valor proteínico de la harina de soya disminuye por la acción del calor (Balloun y col., 1953). Petres y col., (1988) reportan que la hemaglutinina del frijol *Phaseolus vulgaris* conocida por sus siglas en inglés (PHA), mostró 0.78 % de actividad hemaglutinante tras haber sido sometida a ebullición durante 60 o 120 minutos, mientras que esta actividad fue de 3.1 cuando este frijol fue sometido a extrusión durante 20 segundos a 180° C o a calentamiento dieléctrico durante 135 segundos a 115° C de temperatura (Petres y col., 1988; Bielora y col., 1977).

Función de las lectinas en las plantas

No han sido especificadas las funciones precisas de las lectinas en las plantas, pero ha sido sugerido que juegan algún papel importante en su defensa, ante el ataque de bacterias, hongos y en particular de insectos. Esta propiedad de las lectinas ha empezado a ser explorada (Gatehouse y col., 1995). Las lectinas están involucradas también en el desarrollo de las

plantas. Las leguminosas en particular, producen lectinas específicas que permiten la adhesión reversible de bacterias homólogas del género *Rhizobium* con las que tienen interacción simbiótica. La lectina de la alfalfa por ejemplo, permite la interacción con los lipopolisacáridos (LPS) de *Shinorhizobium meliloti*, pero no con LPS de otras especies de rhizobia. Así mismo, la lectina del frijol soya, permite exclusivamente la interacción simbiótica con los LPS de *Bradirhizobium japonicum* (Hirsch, 1999). La mayoría de las lectinas vegetales, se encuentran en vacuolas de las paredes celulares e intersticios tisulares de cada uno de sus órganos, de sus granos y principalmente en los pelos del sistema radicular de la raíz en donde interactúa el *Rhizobium*. De la simbiosis, resulta la nodulación y la fijación de nitrógeno ambiental que regulan el crecimiento de la planta (Hirsch, 1999). Estas moléculas podrían estar involucradas también en el almacenamiento de proteínas, en la movilización de las reservas de fósforo durante la germinación de las plantas y, en la activación de la fosfatasa ácida indispensable en múltiples reacciones bioquímicas durante el crecimiento y el desarrollo; transferencia de señales, regulación del metabolismo por desfosforilación de proteínas y transferencia de energía, liberación de fosfato inorgánico al medio ambiente a partir de fosfato orgánico. (Aoyama y col., 2001).

Efecto de las lectinas en animales

Las lectinas pueden interactuar con la membrana celular de muchos tipos de células en cultivo por ejemplo linfocitos, células intestinales, adipocitos, células endocrinas y células tumorales entre otras (Kilpatrick y col., 1986). El efecto de algunas lectinas de vegetales, es perjudicial para el crecimiento y la salud de los animales que las consumen. Las lectinas de los frijoles *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius*, de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *leucocarpus* y *cruentus* y del hongo *Agaricus bisporus* entre otras, son consideradas como francamente perjudiciales para las ratas debido a las alteraciones metabólicas y lesiones que provocan en el tubo digestivo de estos animales (Sotelo y col., 1983; Banwell y col., 1988; Calderón de la Barca y col., 1988; Oliveira y col., 1989; Ochoa y Zenteno, 1990; Pusztai, 1991; Ortiz y col., 1992). En contraste, la interacción de la lectina LEL del tomate *Lycopersicon esculentum* con las vellosidades del intestino, no provoca efectos nutricionales adversos y por lo contrario tiene la propiedad de inhibir la transformación maligna de linfocitos humanos (Kilpatrick y col., 1985 y Kilpatrick y col., 1986). Igualmente, la lectina de ajo, *Allium sativum* L., ha demostrado ejercer actividad

antitumoral por inducir apoptosis y reducir significativamente el crecimiento y la síntesis de DNA de células tumorales de linfoma histiocítico y de leucemia promielocítica de humanos (Karasaki y col., 2001).

Patogenia del efecto de las lectinas

En modelos experimentales, las lectinas interactúan no solo con los carbohidratos específicos de la membrana de las microvellosidades intestinales, sino también con los de bacterias de la microflora así como de los elementos del glicocalix (Pusztai, 1991). La interacción de la lectina con el epitelio intestinal, destruye las microvellosidades de los enterocitos; la lectina es incorporada al citoplasma por medio de pinocitosis, las mitocondrias se hinchan, el retículo endoplásmico se fragmenta, se generan vacuolas y se forman estructuras semejantes a lisosomas con citosegresomas; en las células tallo de las criptas de la mucosa intestinal se incrementa la síntesis de proteína y el proceso de proliferación por lo que resulta hiperplasia de enterocitos y de células caliciformes por lo que, aumenta la síntesis y excreción de moco en las heces. A consecuencia de las extensas alteraciones morfológicas y funcionales en todo el epitelio del tubo digestivo pero principalmente en el del intestino se genera indigestión, mala absorción de nutrientes y crecimiento deficiente (Sotelo y col., 1983; Calderón de la Barca y col., 1988; Oliveira y col., 1989; Ochoa y Zenteno, 1990; Pusztai, 1991; Ortiz y col., 1992).

Sotelo y col. (1983) estudiaron las alteraciones ultra-estructurales del duodeno de ratas a las que se les administraron 3 ml de un extracto crudo de *Phaseolus acutifolius* por medio de sonda por vía oral. Estos autores señalan que al cabo de 7 horas posadministración, las células epiteliales absorbentes del duodeno presentaron: destrucción de las microvellosidades, hinchazón de las mitocondrias, fragmentación y vacuolización del retículo endoplásmico así como incremento en la cantidad de estructuras semejantes a lisosomas con citosegresomas. Calderón de la Barca y col. (1988) observaron que el suministro de lectina de *Amaranthus cruentus* provocó que las ratas del grupo experimental sufrieran crecimiento corporal deficiente asociado a atrofia de las vellosidades de la mucosa intestinal, destrucción de las microvellosidades del epitelio, hiperplasia de las células caliciformes productoras de moco y de las células parietales de la mucosa gástrica. Pusztai y col. (1988) consideran que la hiperplasia epitelial del intestino de ratas inducida por el efecto mitogénico de la lectina PHA fue ineficaz por no haber incrementado ni la digestión ni la absorción ya que el peso de las

ratas experimentales fue menor al del grupo testigo. El desarrollo de hiperplasia intestinal fue corroborado en este caso, por ser mayor el peso del yeyuno e ileon, mayor la cantidad de RNA y DNA totales, mayor valor de RNA/proteína y menor el de DNA/proteína, en las ratas del grupo experimental en relación a las del grupo control.

Algunos tipos de lectinas tras haber sido incorporadas por pinocitosis al citoplasma de los enterocitos, lo atravesaron incluidas en vesículas endocíticas. Posteriormente, fueron liberadas posiblemente en el espacio intercelular, y al cabo de una hora, el 5 % de la lectina ingerida fue encontrada en el torrente sanguíneo (**Bardocz y col.**, 1995). Sin embargo, la cantidad de PHA incorporada a la sangre de ratas convencionales fue mayor que en ratas libres de patógenos específicos y dependió también, de la especificidad de la lectina (**Pusztai**, 1991; **Mendez y col.**, 1998). Estos autores observaron que la Concanavalina A, se adhirió a las células epiteliales del tubo digestivo de pollos de engorda, posteriormente pasó a la circulación sanguínea general e indujo una respuesta inmune sin afectar la producción de anticuerpos en contra de *Brucella abortus*.

La mayoría de las lectinas son antigénicas, por lo que inducen la respuesta inmune cuando son inyectadas o bien ingeridas por los animales (**Pusztai**, 1991 y **Mendez y col.**, 1998). La naturaleza y amplitud de la respuesta inmune ante el consumo prolongado, varía considerablemente según el tipo de lectina. Fue observado que ratas alimentadas con dietas que contenían la lectina PHA; desarrollaron altos títulos de anticuerpos específicos IgG anti-PHA y que tras exposiciones repetidas desarrollaron una respuesta secundaria contra la lectina. Los autores infirieron que probablemente el sistema inmune del intestino resultó incompetente para prevenir la nueva interacción de la lectina PHA con las microvellosidades intestinales (**Pusztai**, 1991). Esta hipótesis pudo ser corroborada seis años después por **Pusztai y col.** (1997) al observar que la evidencia de respuesta secundaria ante SBA fue mínima, mientras que fueron detectados niveles altos de secreción de anticuerpos IgA e IgM anti-SBA, que probablemente redujeron la interacción de la SBA ante una nueva exposición.

Características generales de la harina de soya (Glycine max)

A pesar de que la harina de soya es rica en proteína, se ha demostrado que cuando se encuentra cruda, contiene factores antinutricionales que interfieren en el crecimiento y ganancia de peso de varias especies de animales (**Balloun, 1980 y Grant y col., 1988;**). Ha sido comprobado que el valor nutritivo de la harina de soya mejora significativamente si es cocida en autoclave a 15 libras de presión de vapor durante 20 a 30 minutos (**Balloun y col., 1953; Hull y col., 1968; Latshaw y Clayton, 1976; Mitchell y col., 1972; Wood y col., 1971; Nitsan y Nir, 1977**).

Los factores antinutricionales de la soya cruda son numerosos. Entre los más estudiados por su efecto detrimental, son 2 proteasas y la lectina SBA, que son termolábiles (**Balloun, 1980; Coates y Hewitt, 1970, Liener, 1994**). La soya contiene otros factores antinutricionales aunque menos nocivos y que son relativamente termoestables; las saponinas, factores bociogénicos, raquíctogénicos, alergénicos, quelantes de minerales traza, taninos, fitoestrógenos, oligosacáridos generadores de flatulencia, fitasas y ureasa (**Liener, 1994 y Monari, 1992**). Los inhibidores de las proteasas, son conocidas como el inhibidor de Kunitz que bloquea solo a la tripsina y el de Bowman-Birk que inhibe tanto a la tripsina como también a la α -quimotripsina, y que han sido estudiados en poligástricos, en ratas y en aves (**Balloun, 1980; Baintner, 1993; Liener, 1994**). **Applegarth y col. (1964)** señalaron que en pollos, el consumo de soya cruda provoca hipertrofia del páncreas y depleción de zimógeno en los acinis pancreáticos. La SBA al igual que la de otras leguminosas, es una hemaglutinina que ha demostrado inhibir el crecimiento de ratas por interferir la absorción de nutrientes al nivel intestinal (**Balloun, 1980; Liener, 1994; Grant y col., 1988**).

Características químicas y propiedades de la lectina de soya (SBA)

La SBA tiene al igual que todas las lectinas, la propiedad de inducir la hemaglutinación de glóbulos rojos de conejo y del grupo A de humano; característica por la cual ha sido detectada en granos, alimentos o excretas. La SBA es una proteína de 110,000 Daltons compuesta por cuatro unidades de cadenas de polipéptidos con alanina en el extremo amino terminal. La SBA reconoce el receptor N-acetil-D-galactosamina y galactosa (GalNAc/Gal) presentes en las microvellosidades del epitelio del intestino delgado de varias especies. (**Reyes y col., 1998; Loris y col., 1998; Vijayan y col., 1999**).

Historia del empleo de la soya

Desde hace aproximadamente 4,000 años, en los países orientales la soya ha sido considerada como fuente valiosa de proteína y de energía en la alimentación de humanos. Sin embargo, solo hasta alrededor de 1950, se generalizó en todo el mundo, el empleo de este frijol en las dietas para aves y otros animales domésticos debido a su composición química, a su porcentaje de proteína y perfil de aminoácidos, a su alta disponibilidad en la mayoría de los mercados mundiales y a su bajo costo en relación al de los productos de origen animal (**Balloun**, 1980). Desde entonces han aumentado los estudios con respecto al valor nutritivo, a la absorción, la digestibilidad y la disponibilidad de los aminoácidos de la harina de soya, tanto en aves como en otros animales domésticos (**Bielorai y col.**, 1987 y **Quisenberry y col.**, 1972).

Productos de soya en el mercado

La calidad de los productos de soya así como su contenido de proteína y concentración de factores antinutricionales varía en función de la variedad (genotipo) y de las condiciones de cultivo de soya, el clima, el estado fisiológico de la planta y método de procesamiento (**Grieshop y col.**, 2001). Los productos comerciales del frijol soya para la formulación de alimento para animales son principalmente: la pasta de soya, la pasta de soya descascarillada, la soya integral extruida y la soya integral expandida (**Hull y col.**, 1968; **Rogler y Carrick**, 1964; **Mitchell y col.**, 1972; **Latshaw y Claytin**, 1976; **Miles y Featherston**, 1976; **Nitsan y Nir**, 1977; **Balloun**, 1980; **Le Lorier**, 2000; **Navarro**, 2001). La harina o pasta de soya desgrasada es subproducto de la extracción mecánica de aceite o mediante solventes y que antes de ser empleada para la formulación de alimentos para animales, es cocida en seco o en medio húmedo durante 30 minutos, entre 110 y 168° C, al vapor, en seco o por acción de rayos infrarrojos. Contiene 44% de proteína, 0.5% de grasa, 7% de fibra y 12% de humedad (**Balloun**, 1980; **Rady y col.**, 1987; **Le Lorier**, 2000; **Navarro**, 2001).

La pasta de soya descascarillada, es también subproducto de la extracción del aceite para lo cual el grano es previamente resquebrajado y descascarillado. En estas condiciones la pasta de soya desgrasada contiene entre 48 y hasta 50% de proteína (dependiendo de la variedad de soya), 0.5% de grasa, 3.3% de fibra y 12% de humedad (**Balloun**, 1980 y **Parsons y col.**, 1992).

La soya integral extruida en seco o en medio húmedo, o bien, tostada, conocida como “full-fat soybean”, es uno de los productos más empleados recientemente en el sector de alimentos balanceados. Es una preparación rica en energía debido a que conserva todo su contenido de lípidos. Esta presentación es elaborada por extrusión, en la que el grano es sometido a fricción y presión que lo desquebraja y lo cuece por liberarse calor durante este proceso. Su composición típica es de 33 a 40 % de proteína, de 16 a 20% de grasa, de 5 a 6% de fibra, y de 7 a 12 % de humedad (**Wood y col., 1971; Navarro, 2001; Perilla y col., 1997**)

El desarrollo de la elaboración de la soya integral expandida, fue impulsado por la evolución constante y necesidades del mercado. Este producto es obtenido por medio de un expansor que genera más de 90°C de calor mediante fricción, lo cual provoca la expansión de los ingredientes e incrementa la solubilidad de la proteína que llega a ser de 92% y así se incrementa su valor nutrimental en relación a los productos de soya hasta ahora conocidos (**Navarro, 2001**).

II.- JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Ha sido ampliamente estudiado, el efecto perjudicial de la soya cruda en pollos de engorda y gallinas de postura. Sin embargo, estas investigaciones fueron enfocadas al efecto en cuanto a la baja ganancia de peso o producción debido a las dos antitripsinas, que provocan indigestión de las proteínas por causar disfunción, hipertrofia y depleción de zimógeno en los ascinis del páncreas (**Applegarth y col., 1964; Dal Borgo y col., 1967, Coates y Hewitt, 1970; Latshaw y Claytin, 1976; Bielorai y col., 1977; Nitsan y Nir, 1977; Noy y Sklain, 1995**). No han sido referidas las características morfológicas de las excretas, ni las lesiones en tubo digestivo asociadas a la presencia de la lectina SBA, ni al efecto de esta lectina sobre la pigmentación en pollo de engorda que sufre indigestión por consumo de soya cruda.

Son numerosos los factores etiológicos de origen ambiental, biológico y tóxico que se han visto involucrados en la patogenia del STR. Sin embargo hasta el momento, no ha podido ser reproducido experimentalmente dicho síndrome de los pollos de engorda, tal cual se presenta en brotes de campo (**Fehervari, 1998 y López y col., 2000**). Los múltiples y variados signos clínicos apreciados en el curso de este padecimiento han dado origen a numerosas sinonimias (**Fehervari, 1998 y López y col., 2000**). Este síndrome ha sido referido en México como síndrome de tránsito rápido debido a que en las excretas se aprecian abundantes partículas de alimento indigesto, entre otros signos (**Fehervari, 1998; Reyes, 1998; López y**

col., 2000; **Kowenhoven**, 1996); síndrome de mala absorción o síndrome de pollos enanos y retrasados debido a la deficiencia de la ganancia de peso que se manifiesta por desuniformidad de peso de las parvadas y desarrollo deficiente de algunos pollos que presentan emplume retrasado o presencia de abundante plumón en aves mayores de dos semanas de edad (**Olsen**, 1977). La denominación de síndrome de pollos pálidos es debido a que con frecuencia las aves desarrollan anemia y no aprovechan las xantofilas que son incluidas en la dieta con objeto de obtener aves con piel amarilla como lo demandan ciertos mercados como el de México (**Good**, 1982 y **Hamilton**, 1987). Las parvadas que sufren STR presentan esencialmente: falta de uniformidad del peso, baja del consumo de alimento, incremento de la conversión alimenticia, disminución de carne obtenida por término del ciclo económico y depreciación por pigmentación deficiente. Aunque no es una característica exclusiva de STR, las excretas tienen la apariencia desmoronada y están mezcladas con gran cantidad de líquido, de partículas de alimento indigesto, de uratos y de moco color naranja (**Kowenhoven y col.**, 1993 y **López y col.**, 2000); también han sido descritas alteraciones como: proventriculitis, erosiones y úlceras de molleja, enteritis no supurativa y atrofia de páncreas son las lesiones más frecuentemente observadas (**Reece y col.**, 1984; **Kowenhoven**, 1996; **Songserm y col.**, 2000).

Las pérdidas económicas asociadas al STR son debidas no solo a la ganancia de peso deficiente sino también, a enfermedades asociadas a mala absorción de nutrientes (vitaminas y minerales) y a enfermedades infecciosas consecuentes a inmunodepresión por la deficiente absorción de proteínas requerida para el desempeño del sistema inmunocompetente (**Kowenhoven y col.**, 1993). Las pérdidas económicas suelen ser aún mayores debido a mortalidad alta y falta de pigmentación en los casos en que se desencadena coccidiosis, propiciada por el incremento de la humedad en la cama (**Tyczkowski**, 1991 y **Goodwin**, 1997). En 1997 en México, fue reportado que de un total de 900 millones de aves producidas en el país, aproximadamente el 40% (360 millones) de los pollos fueron afectados por STR durante 3 meses de ese año (**López Coello C.** Depto. Producción Animal: aves F.M.V.Z. U.N.A.M.; comunicación personal, 1998). Siendo que la conversión aumentó de 2.1 a 2.3 (0.2 g/g), cada pollo para alcanzar 2.5 kg de peso, consumió aproximadamente 500g más de alimento para lograr el peso indicado, requiriendo 7 días más durante el ciclo productivo (**North y col.**, 1993 y **Quintana**, 1991). Esto representó un consumo de 180 000 Ton más de

alimento por año que, a 2,500 pesos/Ton, repercutió en 450 millones de pesos de pérdida para la industria avícola.

Hasta el momento no existen evidencias del efecto de la SBA en pollos de engorda. Sin embargo, es posible que la SBA pudiera provocar alteraciones de los procesos de digestión/absorción de nutrientes y de pigmentos en el caso de que se encuentre su receptor específico GalNAc/Gal, en las microvellosidades de los pollos de engorda (**Sigma-Chemical**, St Louis, MO, USA y **Candy y col.**, 2003). Resulta relevante el determinar el efecto dosis respuesta de la SBA y el posible papel que pudiera jugar en el desarrollo de STR, debido a que en las pastas de soya desgrasada comercial empleadas profusamente como fuente proteínica en la formulación de alimentos en la avicultura, persisten residuos variables de SBA (**Maenz y col.**, 1999).

III.- HIPÓTESIS DEL PROYECTO

La SBA administrada en la dieta de pollos de engorda causa indigestión y absorción de nutrientes deficiente, debido a las lesiones que provoca en los tejidos del tubo digestivo al interactuar con el receptor GalNAc/Gal presente en el epitelio intestinal. A consecuencia de estas alteraciones en la nutrición, resulta retraso en el crecimiento, alta conversión y baja ganancia de peso, pigmentación cutánea deficiente y emisión de excretas acuosas con partículas de alimento indigestas y moco color naranja.

IV.- OBJETIVOS DEL PROYECTO

1. Evaluar el efecto de la SBA en el tubo digestivo del pollo de engorda, explorando la presencia de esta lectina en el epitelio intestinal por medio de inmunohistoquímica; estudiando las lesiones macroscópicas y microscópicas presentes en proventrículo, molleja, duodeno, intestino medio y páncreas y, llevando a cabo el estudio de las lesiones en ultraestructuras de enterocitos de duodeno.
2. Determinar el efecto patógeno de la soya cruda integral (SCI) en los procesos de digestión y de absorción en el pollo.
3. Evaluar el efecto de la SCI en el proceso de pigmentación cutánea.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS DEL PROYECTO

Diseño experimental

Fueron empleados pollos Avian Farm x Arbor Acres (n = 180) de un día de edad, de 36±1 g, de ambos sexos y alimentados con 6 dietas experimentales. Cada dieta fue administrada a tres grupos de diez pollos (n = 30) que fueron alojados en baterías de jaulas Petersime durante los 42 días. Las dietas fueron formuladas a base de sorgo, pasta de soya desgrasada (PSD) y soya cruda integral (SCI) conforme al método propuesto por **Cuca y col.**, 1996 y utilizando el programa de NUTRION , versión Pro 5.0 (Comercializadora de Software). Todas las dietas fueron isoprotéicas con 22% de proteína cruda en las dietas de iniciación para los primeros 21 días de edad y con 20% de proteína cruda en las dietas de finalización suministradas durante los 21 días restantes. Para que todas las dietas resultaran isocalóricas con 3000 Kcal / kg de energía metabolizable, el aceite faltante en la PSD fue remplazado por aceite de maíz refinado para consumo humano (**Cuadros 1 y 2**). En cada dieta experimental, el porcentaje de PSD fue sustituida por porcentajes crecientes de SCI por lo que, en la del grupo testigo negativo el porcentaje de SCI fue de 0%, en cada dieta consecutiva el porcentaje de sustitución fue 20% mayor y en la sexta, el 100% de PSD fue sustituido por SCI. A las dietas de finalización, les fue agregado 70 mg/kg de xantofila Hi-Gold 60 de Industrial Orgánica S.A. de C.V., Monterrey N.L. México, obtenido de la flor *Tagetes erecta* conocida como Marigold o como Cempasúchil en México (**Cuadro 2**).

La PSD fue obtenida de una planta aceitera mexicana en la que la semilla es descascarillada, molida, sometida a la extracción de aceite por medio de solventes (hexano) y el producto resultante fue desolventizado y cocido a vapor entre 80 y 100°C durante 15 minutos. La SCI utilizada fue de variedad mexicana y simplemente molida hasta obtener una harina que pasara por un tamiz 20 antes de ser integrada a la formula alimenticia.

Alojamiento y manejo

El experimento, fue llevado a cabo en una caseta experimental del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM (CEIEPA) en la delegación Tlahuac del Distrito Federal, México, a 2 250 m de altitud con temperatura media anual de 18°C, precipitación total anual concentrada principalmente en verano varía entre 600 y 1000 mm (I.N.E.G.I., 2002). El estudio fue realizado del 29 de abril al 9 de junio de 1999. A todas las aves les fue proporcionado agua y

alimento a libre acceso, durante los 3 primeros días de edad les fue suministrado un polivitamínico y formula balanceada de minerales (Vitafort -A; Parfarm, S.A., México, D.F.), disuelto en el agua de bebida y fueron vacunadas únicamente contra la enfermedad de Newcastle, cepa Lasota, vía ocular, a los 10 y 28 días de edad.

Propiedades de las harinas de soya utilizadas

Fueron determinadas la actividad ureásica de la PSD y de la SCI, así como la actividad hemaglutinante y la concentración de SBA en estas harinas de soya y en las dietas experimentales, con objeto de asegurar que los productos utilizados eran apropiados par llevar a cabo el presente estudio. Las cualidades de la PSD pueden variar de una fábrica a otra y de un lote a otro según la variedad y la humedad de la soya empleada, el método utilizado para la extracción del aceite, los grados de calor y el tiempo sometido a este. La ureasa, enzima que cataliza la hidrólisis de urea a amonio y CO₂ y que se encuentra en la soya, no constituye un factor antinutricional pero es termolábil al igual que las proteasas y la lectina que si son factores perjudiciales para la nutrición. El grado de inactivación de la ureasa por medio de calor es directamente proporcional a la de los factores antinutricionales, por lo que la determinación de la actividad ureásica es un indicador confiable de que el proceso de cocción de la PSD fue adecuado y por consiguiente, de que los factores antinutricionales que contiene, fueron inactivados (**Balloun**, 1980). El incremento de pH en soyas crudas varía entre 1.8 a 2.1 mientras que los valores entre 0.1 y 0.3 denotan que la PSD ha sido sometida a un calentamiento adecuado y un valor menor a 0.1 corresponde a PSD en las que por sobrecalentamiento, ha disminuído la digestibilidad de los aminoácidos esenciales (lisina, cistina, histidina y ácido aspártico) y por lo tanto resultan inapropiadas para la buena nutrición de cualquier especie animal (**Tejada**, 1992 y **Parsons, y col.**, 1992).

a) Determinación de la actividad ureásica en PSD y SCI.

La actividad ureásica fue determinada en la PSD y la SCI utilizadas en el presente estudio por medio del incremento de pH acorde al método de **Hayward** (1975) y conforme al protocolo de la **A.O.A.C.** (1990), antes de ser incluidas en la formulación de las dietas del presente estudio.

Los valores de actividad ureásica obtenidos de 0.29 y 2.2 de aumento de pH para la PSD y la SCI respectivamente utilizadas para la formulación de las dietas experimentales,

demuestran que esta enzima estaba inactivada en la primera y activa en la segunda y que por lo tanto la PSD había sido adecuadamente cocida (Balloun, 1980 y Tejada, 1992)

b) Obtención de extractos salinos a partir las dietas y las harinas de soya

Para determinar la actividad hemaglutinante y la concentración de SBA por medio de la prueba de inmunodifusión, fueron obtenidos extractos preparados a partir de la PSD, la SCI y de cada una de las dietas experimentales, conforme al método descrito por Calderón de la Barca y col. (1987). Las harinas fueron suspendidas al 10% (p/v) en NaCl 0.15 M. Después de haber sido agitadas las mezclas durante 2h, fue ajustado el pH a 4 con ácido acético 4M y fueron almacenadas a 4°C durante 12 horas. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min, fue congelado a -20°C hasta ser utilizado.

c) Determinación de la actividad hemaglutinante de la SBA en la PSD y la SCI

Habiendo utilizado diluciones dobles seriadas de los extractos salinos y de SBA purificada (Sigma-Chemical, St Louis, MO, USA) en suspensión de eritrocitos de conejo al 1% con PBS pH 7.4 conforme al método descrito por Beard (1989), y habiendo definido el título de la actividad hemaglutinante de la SBA en la PSD y en la SCI, como el recíproco del factor máximo de dilución en el que fue visible hemaglutinación completa, el título de hemaglutinación del extracto de PSD fue de 1: 3 200, el del SCI de 1: 25 600 y el de la SBA purificada superior a 1: 204 800.

d) Determinación de la concentración de SBA en las dietas experimentales y en las soyas utilizadas.

La concentración de lectina presente en las soyas y dietas experimentales fue determinada por medio de la prueba de Rocket inmuno-electroforesis descrita por Hudson y Hay (1989) utilizando suero policlonal anti-SBA. El suero policlonal anti-SBA, fue producido en un conejo hembra adulta Nueva Zelanda de 3.5 kg al que le fue inoculado 3 mg de SBA (Sigma-Chemical, St Louis, MO, USA) disueltos en 6 ml de PBS y 1:1 de adyuvante de Freund. La emulsión fue inoculada en 4 ocasiones a intervalos de 7 días, en el tejido subcutáneo de la región dorsal del torax. La coneja fue inmunizada en dos ocasiones más, a intervalos de 2 meses. Al cabo de 7 días de la última inoculación, el título de inhibición de hemaglutinación determinado conforme al método β descrito por Beard (1989), fue de 1:32,768. A diluciones doble seriadas de suero del conejo hiperinmunizado, les fue agregado 50 μ l de lectina purificada Sigma 1:100 (0.1mg de lectina en 100 ml de PBS pH 7.2), y después

de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, les fue agregado una suspensión de glóbulos rojos de conejo 1%. El título de inhibición de hemaglutinación fue definido como el recíproco del factor máximo de dilución del suero, en el que fue visible la inhibición completa de la hemaglutinación. La coneja fue desensibilizada por incisión de la médula espinal a través del agujero magno y sangrado a blanco por decapitación. El suero fue congelado a -70°C hasta ser utilizado. El suero obtenido contenía 7.5 g/dl de proteína plasmática, cantidad de la cual 61.89 % correspondía a albúmina y 15.23 %, 4.40 % y 18.47 % a las fracciones α , β y γ respectivamente.

La prueba de Rocket inmuno-electroforesis, fue realizada en gel de agarosa tris glicina pH 8.5 al 1% y suero anti-SBA al 2% producido en conejo. La prueba fue validada por 5 diluciones dobles de SBA purificada iniciadas a partir de 1mg/ml de PBS pH 7.2. Acorde a la curva de calibración, la distancia de migración de la SBA disminuyó ($P \leq 0.01$) de acuerdo a la ecuación $Y = -1.6553 + 0.5711 S$ siendo $R^2 = 0.8023$, el contenido de SBA en la PSD y SCI utilizadas en la formulación de las dietas fue 884 $\mu\text{g/g}$ de harina y 5658 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. La concentración de SBA en las dietas experimentales, se incrementó conforme aumentó el porcentaje de inclusión de SCI. En la dieta testigo 0%, la concentración de SBA estimada fue de 756 $\mu\text{g/g}$, en las dietas experimentales 20%: 1034 $\mu\text{g/g}$; 40%: 2447 $\mu\text{g/g}$; 60%: 2747 $\mu\text{g/g}$; 80%: 3196 $\mu\text{g/g}$ y de 3667 $\mu\text{g/g}$ en la dieta 100%.

Metodología para el análisis de resultados

Los parámetros productivos (consumo de alimento, ganancia de peso e índice de conversión), la relación de consumo de agua/alimento, los valores séricos de ácido úrico y de carotenoides, la pigmentación cutánea así como, los resultados del análisis químico proximal de las excretas, el tamaño de las vellosidades y la cantidad de mitosis/cripta en la mucosa del duodeno e intestino medio, fueron analizados por medio de las pruebas de análisis de varianza, de regresión lineal, cuadrática y cúbica y, los resultados entre tratamientos fueron comparados por la prueba de Tukey, incluidas en el programa SAS (1999). El modelo utilizado fue: $Y_{ij} = \mu + R_i + S_j + \varepsilon_{(ij)}$, siendo γ_{ij} , el efecto de la j-esima observación aleatoria, asociada del i-esimo porcentaje de soya (0, 20, 40, 60, 80 y 100%), μ la media poblacional, R_i el efecto de cada grupo de aves experimental alimentado con diferentes porcentaje de soya, S_j el efecto del i-esimo porcentaje de soya y $\varepsilon_{(ij)}$ el error aleatorio, NID (0, σ^2). Los valores de la frecuencia

de las lesiones macroscópicas gastrointestinales expresadas en %, fueron transformados a arco seno raíz cuadrada de la proporción antes de llevar a cabo el análisis de varianza.

LITERATURA CITADA

- A.O.A.C. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington, Washington (DC): Association of Official Analytical Chemists, **1990**.
- Aoyama, H.; Cavagis, A.D.M.; Taga, E.M.; Ferreira, C.V. Endogenous lectin as a possible regulator of the hydrolysis of physiological substrates by soybean seed acid phosphatase. *Phytochemistry* **2001**; 58:221-225.
- Applegarth, A.; Furuta, F.; Lepkovsky, S. Response of the chicken pancreas to raw soybeans. *Poult. Sci.* **1964**; 43:733-73.
- Baintner, K. Fate of the antinutritive proteins of soybean in the ovine gut. *J. Vet. Med. A.* **1993**, 40, 427-431.
- Balloun, S.L. Soybean meal in poultry nutrition. Kenneth, C.; Lepley, M.S. (Eds). American Soybean Association. The Ovid Bell Press, Inc, Foulton, St Louis MO. USA. **1980**:29-35
- Balloun, S.L.; Jonson, E.L.; Arnold, L.K. Laboratory estimation of the nutritive value of soybean oil meals. *Poult. Sci.* **1953**;32:517-527
- Banwell, JG, Howard RW, Ceri H, Fang K. Dose response effects of phytohemagglutinin lectin on rat small intestine. En Bog-Hansen, T.C.; Freed, D.L.J. (Eds). Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry. Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. USA. **1988**; 6:133-136.
- Bardocz, S.; Ewen, S.W.B.; Grant, G.; Pusztai, A. Reversible effect of phytohaemagglutinin on the grow and metabolism of rat gastrointestinal tract. En: Lectins: Biomedical perspectives. Pusztai, A; Bardocz, S. eds. Taylor and Francis, S. London **1995**; 103-116; En *Gut* **1995**; 37:353-360.
- Beard, C.W. Serologic procedures. In: Purchase, H.G.; Arp, H. L.; Domermuth, H. C.; Pearson, J.E. (Eds.) A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3^o ed. American Association of Avian Pathologists. Kendall/Hunt Publishing Company **1989**; 44: 192-200.

- Bielorai, R.; Tamir, M.; Hurwitz, S. Amino acid absorption along the intestinal tract of chicks fed heated and raw soybean meal. *J. Nutr.* **1977**; 107:1775-1778
- Bielorai, R.; Iosif, B. Amino acid absorption and endogenous amino acids in the lower ileum and excreta of chicks. *J. Nutr.* **1987**; 117:1459-1462.
- Calderón de la Barca A.M.; Vázquez Moreno, L.; Valencia, M.E. The lectin of *Amaranthus cruentus* resists *in vivo* proteolysis and affects the gastrointestinal mucosa of rats. En Bog-Hansen, T.C.; Freed, D.L.J. (Eds), *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. USA, **1988**; 6:125-132.
- Candy, L.; Van Damme E.J.; Peumans, W.J.; Menu-Bouaouiche, L.; Erard, M.; Rouge, P. Structural and functional characterization of GalNac/Gal- specific lectin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**; 308:396-402.
- Coates, M.E.; Hewitt, D. A comparison of the effects of raw and heated soya-bean meal in diets for germ-free and conventional chicks. *Br. J. Nutr.* **1970**; 24:213-225.
- Comercializadora de Software, Nutrion, versión Pro 5.0 (programa computacional PC), Guadalajara (México), **2002**.
- Cuca, G.M.; Avila, G.E.; Pro, M.A. Alimentación de las aves. 8° ed., Universidad Autónoma Chapingo: Chapingo, Estado de México, México. **1996**.
- Dal Borgo, G.; Pubols, M.H.; Mc Ginnis, J. Effect of using sugar or starch in the diet on biological responses in the chick to autoclaving hexan extracted soybean meal. *Poult. Sci.* **1967**; 46:885-889
- Entzian, P.; Barth, J.; Schumacher, U.; Petermann, W.; Ahnhaus, E. Effect of lectins on the number of glucocorticoid receptor sites. En Bog-Hansen T.C.; Freed, D.L.J (Eds). *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA, **1988**; 6:11-115.
- Fasina, Y.; Classen, H.L.; Garlich, D. Effect of autoclave heat treatment on soybean lectin concentration, urease activity and trypsin inhibitor activity. Poultry Science Association, 88th Annual Meeting, Springdale, Arkansas, USA. **1999**; abstract 48.
- Fehervari, T. Actualidades sobre síndrome de tránsito rápido (STR) en pollo de engorda. Memorias del curso "La productividad del pollo de engorda" Asociación de Veterinarios Especialistas en Ciencias Avícolas de Guadalajara A.C., México, **1998**: 35-43.

- Gatehouse, A.M.R.; Powell, K.S.; Peumans, W.J., van Damme, E.J.M.; Gatehouse, J.A. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. In: Lectins: Bimedical Perspectives. Pusztai, A.; Bardocz, S. (Eds) London: Taylor and Francis **1995**; 35-57.
- Goldstein, I.E.; Poretz, R.D. The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine. Liener, I.E.; Sharon, N.; Goldstein, I.J. (Eds). Orlando USA :Academic Press **1986**.
- Good, R.E. The pale birds syndrome. *Poult. Digest* **1982**; 41:278.
- Goodwin, M.A. Update on enteric disease in poultry. Proceeding of 3rd Poultry Health 2000. International Hatchery Practice and International Poultry Production. Atlanta, Georgia. **1997**: 1-18.
- Grant, G.; Watt, W.B.; Stewart, J.C.; Pusztai, A. Local (intestinal) and systemic responses to dietary soybean lectin. En: Bog-Hansen T.C.; Freed, D.L.J. (Eds). Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry. Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. USA. **1988**; 6: 125-132
- Grant, G. Plant lectins. In Secondary Plant Products- Antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Caygill, J.C.; Mueller-Harvey, I. 1^o published, Nittingham, University Press. U.K. **1999**: 87-110.
- Grieshop, C.M.; Fahey, G.C.Jr. Comparison of quality characteristics of soybean from Brazil, China, and United States. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**; 49: 2669-2673.
- Hamilton, P. Síndrome del ave pálida. VIII ciclo de conferencias internacionales sobre avicultura. AMENA, México. **1987**; 207-221.
- Hayward, J.W. Determination and interpretation of test results of urease activity in soybean meal. Technical consultant, Minneapolis, Minn. 1975. Citado en Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Tejada, H.I. México, Sistema de Educación Continua en Producción Animal, A.C., México **1992**.
- Hirsch, A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolisaccharides) in legumes nodulation. *Current Opinion in Plant Biology.* **1999**; 2: 320-326.
- Hudson, L.; Hay, CF. Practical immunology. 3^o ed., pp. 124-131; Oxford, London Blackwell Scientific Publications, **1989**.

- Hull, S.J.; Waldroup, P.W.; Stephenson, A.L. Utilization of unextracted soybean by broiler chicks. Influence of pelleting and regrinding on diets with infra red cooked and extruded soybeans. *Poult. Sci.* **1968**; 4:1115-1120.
- I.N.E.G.I. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, México. <http://inegi.gob.mx>.
- Karasaki, Y.; Tsukamoto, S.; Mizusaki, K.; Sugiura, T.; Gotoh, S. A Garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. *Food Research International.* **2001**; 34; 7-13.
- Kilpatrick, D.C.; Graham, C.; Urbaniak, S.J. Inhibition of human lymphocyte transformation by tomato lectin. *Scand. J. Immunol* **1986**; 24:11-19.
- Kilpatrick, D.C.; Pusztai, A.; Grant, G.; Graham, c.; Ewen, S.W. Tomato lectin resists digestion in the mammalian alimentary canal and binds to intestinal villi without deleterious effects. *FEBS Lett.* **1985**; 185:299-305.
- Kouwenhoven B. Tránsito rápido y alta conversión alimenticia en pollos de engorda. VI Seminario PFIZER sobre nutrición y patología aviar. Cancún, Quintana Roo, Méico **1996**.
- Kouwenhoven, B.; Dwars, R.M.; Smeets, J.F.M. Camas húmedas e incremento en la conversión alimenticia, un nuevo problema en pollos de engorda. Curso de actualización sobre problemas de mala absorción en pollos de engorda. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. México DF. México **1993**; 35-43.
- Latshaw, J.D.; Claytin, P.C. Raw and heated full fat soybeans in laying diets. *Poult. Sci.* **1976**; 55:1268-1272.
- Liener, I.E. Implication of antinutritional components in soybean foods *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1994**; 34; 1:31-67.
- López, C.C.; Fehervari, T.; Arce, M.J.; Ávila, G.E. Síndrome de tránsito rápido en pollos de engorda. V Seminario Avícola Internacional. Enfermedades entéricas de las aves de la Asociación Académica Santanderiana de Patología Aviar; Cartagena de Indias, Colombia. **2000**; 41-59.
- Loris, R.; Hamelryck, T.; Bouckaert, J.; Wyns, L. Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**; 1383:9-36.

- Maenz, D.; Irish, G.; Classen H. Carbohydrates-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. *Ani. Feed Sci. Tech.* **1999**; 76: 335-343.
- Manoj, N.; Suguna, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. *Protein Engineering* **2001**; 14: 735-745.
- Mendez, A.; Vargas, R.E.; Michelangeli, C. Effects of Concanavalin A, fed as a contituyent of Jack bean (*Canavalina ensiformis L*) seeds, on the humoral immune response and performance of broiler chickens. *Poult. Sci.* **1998**; 77:282-289.
- Miles, R.D.; Featherston, W.R. Uric acid excretion by the chick as an indicator of dietary protein quality. *Poult. Sci.* **1976**; 55:98-102
- Mitchell, R.J.; Waldroup, P.W.; Hillard, C.M.; Hazen, K.R. Effects of pelleting and particle size on utilization of roasted soybeans by broilers. *Poult. Sci.* **1972**; 51:506-510.
- Mody, R.; Joshi, S.; Chaney, W. Use of lections as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **1995**; 33:1-10.
- Monari, S. Fullfat soya handbook. American Soybean Association; Center International Rogier- Box 521; 1210 Brussels **1992**.
- Morgan, S.J.; Darling, D.C. Animal cell culture. Bios. Scientific Publishers Limited, St. Thomas House, Becket Street, Oxford OX1 1SJ **1993**.
- Navarro, H.A. Nuevos productos de soya para la alimentación animal. Soya Noticias, Asociación Americana de soya, A.C. Mexico. **2001**; 262:27-29.
- Nilipour, A.H., Butcher, G.D. Síndrome de paso del alimento: un problema global. *Avicultura Profesional* **1996**; 14: 37-39.
- Nitsan, Z.; Nir, I. A comparative study of the nutritional and physiological significance of raw and heated soya beans in chicks and goslings. *Br. J. Nutr.* **1977**;37:81-91
- North, M.O.; Bell, D.D. Manual de producción avícola: 3º Ed.: Traducción MVZ Martinez Haro A.F.: Manual Moderno: México, D.F.- Santafé de Bogota **1993**.
- Noy, Y.; Sklain, D. Digestion and absorption in the young chick. *Poult. Sci.* **1995**; 74:366-373.
- Ochoa, J.L.; Zenteno, E. Bioquímica del amaranto. Universidad: *Ciencia y Técnica* **1990**; 1: 5-9.
- Oliveira, A.C.; Vidal, B.C.; Sgarbieri, V.C. Lesions of intestinal epitelium by ingestion of bean lectins in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1989**; 35: 315-322.

- Olsen, D.E. Isolation of a reovirus-like agent from broiler chicks with diarrhea and stunting. Proceedings of the 26th Western Poultry Diseases Conference. University of California, Davis 1977: 131.
- Ortíz, R.; Sanchez, R.; Páez, A. Montaña, L.F.; Zenteno, E. Induction of intestinal malabsorption syndrome in rats fed with *Agaricus bisporus* mushroom lectin. *J. Agricultural and Food Chemistry* 1992; 40: 1375-1378.
- Parsons, C.M.K.; Hashimoto, K.; Wedekind, K.J.; Han, Y.; Baker, D.H. Effect of pover-processing on availability of amino acids and energy in soybean meal. *Poult. Sci.* 1992; 71: 133-140.
- Perilla, N.S.; Cruz, M.P.; De Belalcázar, F.; Díaz, G.J. Effect of temperature of wet extrusion on the nutritional value of full-fat soybean for broiler chickens. *Brit. Poult. Sci.* 1997; 38: 412-416.
- Petres, J.; Czukor, B. Effect of different heat treatments on hemagglutinin activity in white kidney bean. En Bog-Hansen, T.C.; Freed, D.L.J. (Eds), *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO USA, 1988; 6: 137-139.
- Pusztai, A.; de Oliveira, J.T.A.; Bardocz, S.; Grant, G. Dietary kidney bean lectin-induced hyperplasia and increased polyamine content of the small intestine. En Bog-Hansen T.C.; Freed, D.L.J. (Eds), *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*, "Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. USA, 1988; 6:117-120.
- Pusztai, A.; Ewen, S.W.B.; Grant, G.; Peuman, W.J.; Van Damme, E.J.M.; Rubio, L.; Bardocz, S. Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as grow factor. *Digestion* 1990; 46: 308-316.
- Pusztai, A. *Plant lectins*. Cambridge University Press, Cambridge 1991.
- Pusztai, A.; Gelencser, E.; Grant, G.; Badocz, S. In: Darnsworthy, P.C.; Wiseman, J. (Eds) *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham: Nottingham University Press. 1997: 29-43.
- Quintana, J.A. *Avitecnia (Manejo de las aves domésticas más comunes)* Trillas S.A. de C.V. Mexico, Argentina, España; Colombia, Puerto Rico, Venezuela 1991.
- Quisenberry, J.H.; Fowler, J.C.; Bradley, J.W. The comparative feeding value of 44, 48.5 and 50% protein soybean meal in diets of laying hens. *Poult. Sci.*, 1972; 51: 2093-2097.

- Rady, A.H.; Mostafa, M.M.; Rahma, E.H. Effect of humid and dry heat application on the quality of soybean oil and cake residue. *Egypt. J. Food Sci.* 1987; 15: 37.
- Reece, R.I.; Hooper, P.T.; Bedmon, V.D.; Forsyth, W.M.; Scott, P.C.; Barr, D.A. Field, clinical and pathological observation of a runting and stunting syndrome in broilers. *Vet. Rec.* 1984; 115:483-485.
- Reyes, R.A.; Barbosa, E.; Robles, V.M.T. Lectinas y su relación con Tránsito Rápido (Mala digestión). XVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, PANVET 98, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia 1998: 351-360.
- Rogler, J.C.; Carrick, C.W. Studies on raw heated unextracted soybeans for layers. *Poult. Sci.* 1964; 43:605-612.
- SAS Institute Inc. SAS / STAT version 8 Cary, NC. 1999.
- Sharon, N.; Lis, H. Lectins: cell agglutinating and sugar- specific proteins. *Science* 1972; 177: 949-959.
- Songserm, Th.; Pol, J.M.A.; Van Roozelaar, D.; Kok, G.L.; Wagenaar, F.; Ter Huurne A.A.H.M. A comparative study of pathogenesis of malabsorption syndrome in broilers. *Avian. Dis.* 2000; 44: 556-567.
- Sotelo, A.; González L.A.; González, G.M.T.; Velasco, E., Feria, V.A. Ultrastructural changes of epithelial intestinal cells induced by the ingestion of raw *Phaseolus acutifolius*. *Nutrition Reports International* 1983; 27: 329-337.
- Tejada, H.I. Control de calidad y análisis de alimentos para animales México, Sistema de Educación Continua en Producción Animal, A.C., México 1992.
- Tyczkowski, J. Altered metabolism of carotenoids during pale syndrome in chickens infected with e acervulina. *Poult. Sci.* 1991; 70: 2074-2081.
- Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J.; Pusztai. A.; Bardocz, S. Handbook of plant lectins: Properties and biomedical applications. Chichester: Jhon Wiley and Sons 1998.
- Vijayan, M. ; Chandra, N. Lectins. *Current opinion in structural biology.* 1999; 9: 707-714.
- Wood, A.S.; Summers, J.D.; Moran, E.T. Jr., Pepper, W.F. The utilization of unextracted raw and extruded full-fat soybeans by the chick. *Poult. Sci.* 1971; 50: 1392-1399.

Cuadro 1. Composición de las dietas para iniciación y finalización (g / kg).

Ingredientes	Dietas de iniciación						Dietas de finalización					
	0% ¹	20%	40%	60%	80%	100%	0%	20%	40%	60%	80%	100%
Sorgo 9 %	520.2	504.4	509.4	496.6	482.8	468	568.6	508.8	510.9	511.9	515	516.1
Pasta de soya desgrasada 46%	392	325	240	165	85	0	340	285	220	150	75	0
Soya cruda integral 38%	0	83	162	260	364	474	0	75	151	234	322	411
Aceite de maíz	40	40	41	31	21	11	49	89	76	62	47	32
Fosfato dicálcico	21	21	21	21	21	21	16	16	16	16	16	16
Carbonato de calcio	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	14	14
Sal iodada (NaCl)	4	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	4	4	4	4	4	4
Mezcla de vitaminas ²	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Mezcla de minerales ³	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DL-Metionina 98 %	2.2	2.2	2.2	2	1.8	1.6	2	1.8	1.7	1.7	1.6	1.5
L-lisina HCl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Propionato de Calcio	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Cloruro de colina 60 %	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Bacitracina de Zinc ⁴	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Antioxidante BHT	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Xantofilas (mg/kg) ⁵	0	0	0	0	0	0	70	70	70	70	70	70

¹ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales de iniciación suministradas de 0 a 21 días de edad y de finalización de 22 a 42 días de edad. ² Mezcla de vitaminas constituida por: retinol 3-6 mg, colecalciferol 75µg, α-tocoferol 20 mg, menadiona 2 mg, riboflavina 10 mg, tiamina 4 mg, ácido nicotínico 70 mg, ácido pantoténico 16 mg, biotina 200 µg, piridoxina 5 mg, cianocobalamina 20 µg, ácido fólico 2 mg. ³ Mezcla de minerales constituida por: Cu 3 mg, I 0.4 mg, Fe 80 mg, Mn 110 mg, Zn 90 mg. ⁴ Albac, Apothekermes Laboratoriumas, Oslo, Norway. ⁵ Pigmento Hi-Gold 60.

Cuadro 2. Análisis calculado de nutrientes principales (g/kg) en las dietas para iniciación y finalización.

	Dietas de iniciación						Dietas de finalización					
	0% ¹	20%	40%	60%	80%	100%	0%	20%	40%	60%	80%	100%
Proteína cruda (PC),	220	220	220	220	220	220	200	200	200	200	200	200
Grasa cruda	60	61	85	93	101	110	70	120	120	120	120	120
Calcio	10	10	10	10	10	10	11	9	9	8	8	8
Fósforo disponible	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4
EM Kcal/kg	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Metionina + cistina	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8
Lisina	12	13	13	12	14	12	12	11	12	12	12	13
Acido linoléico	2.2	2.34	3.89	4.01	4.39	4.84	2.68	5.53	5.50	5.48	5.45	5.42
Xantofilas ² (mg/kg)	0	0	0	0	0	0	70	70	70	70	70	70
Na	1.8	1.8	1.7	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Cl	3.6	3.0	2.8	2.9	3.0	3.1	3.4	3.1	3.1	3.1	3.1	3.0
K	9.6	9.6	9.2	9.4	9.5	9.6	9.8	9.6	9.4	9.2	9.0	8.7
Treonina	8.5	8.4	8.3	8.7	9.0	9.4	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2	8.5
Triptofano	2.8	3.3	3.2	3.4	3.5	3.7	2.8	3.0	3.1	3.2	3.2	3.3
Arginina	14.1	14.5	15.5	16.2	16.9	17.8	13.8	13.3	13.8	14.5	15.1	15.8

¹ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales de iniciación suministradas de 0 a 21 días de edad y de finalización de 22 a 42 días de edad.

² Pigmento Hi-Gold 60.

VI.- EFECTO DE LA SCI Y DE LA SBA QUE ESTA CONTIENE, EN LOS TEJIDOS DEL TUBO DIGESTIVO DEL POLLO DE ENGORDA.

INTRODUCCIÓN

En la industria avícola no es utilizada la SCI en la formulación de dietas debido a que provoca conversión alimenticia deficiente, indigestión de proteínas y disfunción pancreática al igual que otras leguminosas crudas (Coates y Hewitt, 1970; Putsztai, 1991; Bielori y Iosif, 1987). Las lectinas han demostrado ser en parte responsables de las alteraciones metabólicas antes señaladas, debido a que interactúan con los glicoconjugados de la membrana y del glicocalix que recubre las vellosidades del epitelio del tubo digestivo de ratas. En seguida, las lectinas son incorporadas al citoplasma celular, provocando desorganización y ruptura de las microvellosidades, alteraciones ultraestructurales y funcionales, atrofia de las vellosidades, síntesis excesiva de moco así como, hiperplasia epitelial definida como proliferación celular excesiva de la mucosa intestinal y de las células parietales gástricas de ratas. (Calderón de la Barca y col., 1988; Greer y col., 1985, Putsztai y col., 1988, Ortiz y col., 1992; Sotelo y col., 1983; Fang y col., 1993; Grant, 1999). El intestino de ratas, pesó más del doble al cabo de 7 días de consumir entre 30 y 60 mg de lectina PHA purificada. El mayor crecimiento del peso del intestino estuvo relacionado con hiperplasia de las células tallo de las criptas e hipertrofia definida como el aumento de tamaño de las células del epitelio de las vellosidades (Pusztai, 1991 y Bardocz y col., 1995). El aumento del crecimiento del intestino y del páncreas inducido por la lectina PHA o por la SBA, se debió a que ambas lectinas estimularon a las células neuroendócrinas del intestino con incremento de la cantidad de colecistoquinina (CCK) (Herzig y col., 1997) por lo que, Grant (1999) propuso que, probablemente también inducían la secreción de otras hormonas sintetizadas por estas mismas células que intervenían en la proliferación celular y crecimiento del intestino. La CCK en mamíferos es un importante regulador de las funciones gastrointestinales; contracción de la vesícula biliar, secreción y crecimiento del páncreas, vaciamiento del estómago, y saciedad (Jordinson y col., 1997). En aves la CCK y la secretina se originan en la primera porción del intestino. La CCK es agonista de la gastrina y junto con la secretina estimulan la secreción tanto de H⁺ como de pepsina a diferencia de su función en mamíferos (Duke, 1986; Martinez y col., 1993).

Se desconoce el mecanismo por medio del cual las lectinas provocan hiperplasia. Sin embargo, **Pusztai y col.** (1988); **Grant y col.** (1990) y **Bardocz y col.** (1995) observaron que a la vez que se generó hiperplasia del epitelio intestinal, aumentó el peso del intestino, el contenido de DNA/ RNA, la concentración de poliaminas así como de las enzimas estimulantes e inhibitoras de la proliferación de las células tallo en las criptas.

La hiperplasia en la mucosa intestinal, es producida por alteraciones fisiopatológicas del epitelio y no solo por efecto de lectinas incluidas en la dieta. Fisiológicamente, el epitelio que recubre las vellosidades de la mucosa intestinal es constantemente renovado a partir de la proliferación continua de las células tallo ubicadas en las criptas de Lieberkühn. Las células tallo de las criptas de Lieberkühn, son las células madres que, por medio del proceso de diferenciación dan origen a todos los tipos celulares del epitelio de las vellosidades intestinales ya sean enterocitos, células caliciformes, células enterocromafines o las de Paneth (**Bjerknes y Cheng**, 1999). Las células recién generadas en las criptas desplazan a las formadas anteriormente de manera que se desarrolla un flujo celular a lo largo de las vellosidades, desde las criptas, hacia el vértice de la vellosidad. A medida que son empujadas las células, estas se diferencian, maduran a nivel de las criptas de Lieberkühn, cumplen su función durante su migración hasta llegar al extremo libre de la vellosidad en donde finalmente se degeneran, sufren necrosis y se descaman (**Bjerknes y Cheng**, 1999). El reemplazo fisiológico del epitelio del tubo digestivo, resulta de la acción de múltiples factores mitogénicos tales como hormonas secretadas por las células de Paneth, factores de crecimiento y principalmente, poliaminas procedentes de la sangre, de los alimentos por descomposición bacteriana de las proteínas de origen animal o bien, de los enterocitos que las sintetizan *de novo* (**Pusztai**, 1991 y **Bardocz y col.**, 1995). La concurrencia del incremento de poliaminas y de hiperplasia en las criptas de Lieberkühn por el efecto de lectinas, ha sido evidenciada en ratas pero no en aves (**Pusztai**, 1991 y **Grant y col.**, 1990). Sin embargo, se desconoce la interrelación bioquímica entre las lectinas y las poliaminas.

Las poliaminas son sintetizadas en los enterocitos, a pesar de que estas son células maduras y que ya no se reproducen (**Jhonson y col.**, 1995). La espermidina y la espermita, son las poliaminas principalmente involucradas en la regulación de la expresión de genes, crecimiento, proliferación, diferenciación, transformación tumoral y apoptosis celular (**Heby**, 1981; **Tabor y Tabor**, 1984; **Thomas y Thomas**, 2001; **Notarnicola, y col.**, 2003). La

putresina precursor de estas dos poliaminas, es producto de la descarboxilación de la ornitina por medio de la ornitina descarboxilasa (ODC). La ornitina puede provenir del plasma, de la dieta, del ciclo de la urea o bien formarse a partir de la arginina. La putresina da origen a la espermidina y esta a su vez a la espermina con la intervención de la S-adenosil-metionina descarboxilasa (AdoMetDC) (**Morgan y Darling**, 1993). La espermidina/esparmina N¹-acetiltransferasa (SSAT) es la enzima que degrada las poliaminas en el caso de que se encuentren en exceso en el citoplasma celular. La síntesis de las enzimas ODC, AdoMetDC y SSAT está sujeta al control del proceso de retroalimentación regida por la concentración de poliaminas intracelulares y por su degradación por la antienzima 26S proteosoma mediante el gasto de gran cantidad de energía mediada por ATP (**Coffino**, 2001 y **Suzuki y col.**, 1994).

La incorporación de poliaminas exógenas es generalmente poca pero se incrementa por el estímulo del factor de crecimiento, de hormonas y por bajos niveles de poliaminas intracelulares. La incorporación de poliaminas esta mediada por consumo de gran cantidad de energía, es dependiente de calor y de Na⁺ activado. Fueron incorporadas grandes cantidades de poliaminas exógenas en células tratadas con α -difluorometilornitina que es un potente fármaco inhibidor de la ODC y por consiguiente de la biosíntesis de poliamina (**Morgan y col.**, 1999).

A nivel ultraestructural la lectina de *P. acutifolius* provocó en ratas, destrucción y desorganización extensa de las microvellosidades de los enterocitos, ruptura del retículo endoplásmico rugoso principalmente y tumefacción de las mitocondrias que mostraron matriz pálida y distribución circular de las crestas así como incremento en la cantidad de estructuras semejantes a lisosomas con citosegresomas (**Sotelo y col.**, 1983). No han sido documentadas las alteraciones tisulares asociadas a la incorporación de la SBA a las células epiteliales del intestino de aves. De ahí que, el propósito fue determinar las lesiones gastrointestinales que desarrollan particularmente los pollos de engorda en presencia de SBA interactuando con el epitelio intestinal como fue demostrado por inmunohistoquímica en el estudio descrito en el capítulo VII del presente documento.

HIPOTESIS

La SBA de la SCI incluida en la dieta de pollos de engorda, provoca atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las células epiteliales en intestino y lesiones en los tejidos del tubo digestivo del pollo de engorda.

OBJETIVOS

Señalar las lesiones macroscópicas, histológicas y ultraestructurales en los tejidos del tubo digestivo del pollo de engorda, asociadas a la presencia de SBA en el epitelio intestinal.

Comparar entre tratamientos, la cantidad de mitosis en las criptas de Lieberkühn, y el largo de las vellosidades en duodeno y en intestino medio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Histología

A los 42 días de edad, se llevó a cabo la necropsia de 9 aves por tratamiento con 0, 20, 40, 60, 80 y 100% de SCI después de haber sido desensibilizados y sacrificados por medio de descarga eléctrica en la mucosa de la cavidad oral y de la cloaca. Después de haber sido registradas las lesiones macroscópicas observadas en el tubo digestivo, para el estudio histológico, fueron obtenidas muestras transversales de cada pollo de un cm de ancho a partir de la porción media del proventrículo, de un cm de largo del tercio medio de las dos ramas del asa duodenal junto con páncreas y de intestino medio al nivel del divertículo de Meckel. Las muestras fueron fijadas en formalina al 10% durante 24 horas, procesadas y embebidas en parafina (Paraplast X-TRA Oxford Labware, St. Louis, MO, U.S.A., de fusión entre 50 and 54° C), seccionadas en cortes de 3-4 μm de espesor y teñidas con hematoxilina y eosina, conforme al método de rutina convencional (Luna, 1968).

La evaluación de la severidad de las lesiones microscópicas fue llevada a cabo conforme a los criterios señalados en los **Cuadros 3, 4 y 5**. La medición del largo de las vellosidades y la evaluación de la hiperplasia epitelial por conteo de mitosis por cripta de Lieberkühn, fueron realizadas con un microscopio fotónico (Leica, modelo Gallen III, alemán). El estudio morfométrico de las vellosidades, fue realizado con una lente reticulada con 20 cuadros por lado, que fue colocada en el ocular 10X. Por medio de un micrómetro de platina, cada subdivisión del retículo midió 185.7 μm por lado, con el objetivo 4X, 75 μm con el objetivo 10X. Las vellosidades de duodeno fueron medidas con el objetivo 4X y las de

intestino medio con el de 10X para incluir en cada caso, la totalidad de las vellosidades en el área del retículo. Fueron medidas 10 vellosidades de 9 pollos por dieta experimental, eligiendo solo las vellosidades que estaban rectas y que presentaban la descamación característica en el ápice, lo cual aseguraba que habían sido cortadas completas. Para evaluar la hiperplasia epitelial fueron contadas las mitosis de 10 criptas de Lieberkühn (mitosis / cripta) de 9 pollos por tratamiento. Fueron consideradas todas aquellas células, cuyo núcleo presentaba la morfología de las diferentes fases de la mitosis incluso la citocinesis, que fue contada como una unidad (**Paniagua y col.**, 2003 y **Dellmann**, 1993). Solo fueron contadas las mitosis incluidas en el campo óptico del objetivo 100X, colocando el borde inferior de la cripta sobre el perímetro del campo óptico y eligiendo solo las criptas cortadas longitudinalmente.

Microscopía electrónica

Inmediatamente después de haber sido sacrificadas las aves, fueron tomados para la microscopía electrónica, 3 trozos de 3 mm³ abarcando toda la pared del asa ascendente del duodeno de 3 aves de los tratamientos 0 % SCI y 100 % SCI, en el área adyacente inmediata de donde fueron tomadas las muestras para histología.

Las muestras obtenidas fueron rápidamente cortadas en pequeños fragmentos, fijadas en una solución al 2.3% de glutaraldehído en buffer de cacodilato 0.2M, pH 7.2, postfijadas en tetraóxido de osmio al 1 %, deshidratadas con concentraciones crecientes de soluciones de etanol, enjuagadas en óxido de propileno e infiltradas y embebidas en araldita (**Mayer**, 1988 y **Hayat**, 1986). Se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm de espesor, que fueron teñidos con azul de toluidina y examinados con el microscopio fotónico para seleccionar las áreas de interés para cortes finos. Los cortes finos fueron teñidos con acetato de uranilo, posteriormente con citrato de plomo y estudiados en un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss, modelo EM 900 alemán) de la Fac. Med. Vet y Zoot. UNAM.

Análisis estadístico

Los porcentajes de presentación de lesiones macroscópicas gastrointestinales fueron inicialmente transformados a la proporción arcoseno raíz cuadrada de la proporción y evaluadas por análisis de varianza incluido en el programa SAS (1999).

Fue calculado el promedio de severidad de cada lesión en cada tratamiento y los valores del promedio de la severidad total de todas las lesiones observadas en cada tratamiento, fueron analizados y comparados por medio de las pruebas de Kruskal Wallis y

Wilcoxon. La comparación entre medias del largo de las vellosidades y las mitosis / cripta, fue llevada a cabo por la prueba de análisis de varianza y por la prueba de Tukey. El análisis de regresión para el largo de vellosidades y cuantificación de mitosis / cripta fue obtenido por el método de cuadrados mínimos y por correlación linear de Pearson incluidos en el programa SAS (1999). El modelo utilizado fue: $Y_{ij} = \mu + R_i + S_j + \varepsilon_{(ij)}$ siendo Y_{ij} el efecto de la j -ésima observación aleatoria de cada parámetro asociado al i -ésimo porcentaje de soya (0, 20, 40, 60, 80 y 100%); μ la media poblacional; R_i el efecto de cada grupo experimental de aves alimentadas con porcentaje diferente de soya; S_j el efecto del j -ésimo porcentaje de soya y $\varepsilon_{(ij)}$ el error aleatorio, NID (0, σ^2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de proventrículo y molleja

En la mucosa del proventrículo fue observado ausencia de papilas y quistes en la capa glándular como se indica en el **Cuadro 6**. (**Fig 1**). Las papilas o prominencias crateriforme observables macroscópicamente, en la mucosa del proventrículo corresponden a los meatos de las glándulas gástricas lobulares secretoras del jugo gástrico que se encuentran en la capa subyacente (**Hodges**, 1974 y **McLelland**, 1979). La ausencia de papilas sugiere engrosamiento de la mucosa ya que, en comparación con la imagen microscópica de la mucosa normal (**Fig. 2**), la ausencia de papilas se vió asociada a atrofia de la mucosa, hiperplasia del epitelio columnar que recubre las glándulas tubulares de la mucosa del proventrículo, a infiltración de exudado seroso, de linfocitos y de granulocitos (heterófilos) (**Fig. 3 y 4**) propia de la inflamación y a la formación de nódulos linfoides que hace parte de la respuesta inmune (**Cuadro 7**) (**Cheville**, 1999 y **Riddell**, 1996). Las glándulas proventriculares quísticas observadas durante la necropsia únicamente en los tratamientos 0% y 20% de SCI como es señalado en el **Cuadro 6**, pudieron haberse originado por colapso de los meatos glandulares a causa de la hiperplasia del epitelio de la mucosa y por la presión ejercida por el exudado inflamatorio circundante (**Fig.4**). A su vez, la obstrucción de los meatos glandulares, pudo haber provocado dilatación de las cisternas colectoras y atrofia del parénquima glandular por acúmulo del jugo gástrico.

En el **Cuadro 6** se observa que la dilatación del proventrículo y de la molleja así como, la presencia de partículas de alimento en el contenido duodenal, fueron observadas simultáneamente en todos los tratamientos. Las aves no poseen un verdadero esfínter pilórico como los mamíferos. Por lo que, el quimo producto de la digestión en proventrículo y molleja, se filtra hacia el duodeno a través de un conducto estrecho, en el que se encuentran repliegues de la capa queratinosa de la molleja que normalmente, no permite el paso de partículas de alimento aún indigestas (**Fig. 5**) (**Siegel y col.**, 1982 y **McLelland**, 1979). La posible razón por la cual fueron encontradas partículas de alimento aún indigestas en la luz del duodeno e intestino medio, es que la conexión entre la molleja y el duodeno haya sufrido una dilatación imperceptible que no fue apreciada macroscópicamente.

No fueron apreciadas diferencias, en cuanto a queratolisis difusa o en el límite entre istmo y molleja y a úlceras dispersas o en el límite gástrico de la molleja que midieron entre 2mm y 10 mm (**Fig. 6**). Estas lesiones gástricas son frecuentemente observadas, sin embargo no ha sido esclarecida su etiología ni su patogenia. Han sido implicados como responsables del desarrollo de estas lesiones; el estrés, anticoccidianos, ácidos grasos, antioxidantes, sulfato de cobre, óxido de zinc y micotoxinas entre otros (**Grabarevic y col.**, 1993 y **Huff y col.**, 1997). Las lesiones gástricas más severas observadas en aves, han estado asociadas a intoxicaciones por aminas biogénicas: putresina, cadaverina, mollerossina, histamina producto de la degradación bacteriana de aminoácidos en dietas formuladas con harinas de pescado o de carne mal conservadas (**Harry y col.**, 1975; **Rossetot y col.**, 1995; **Bermudez y Firman**, 1998).

Las aves de los seis tratamientos experimentales, presentaron metaplasia definida como sustitución de un tipo de células maduras por otro de la misma estirpe embrionaria de las células principales secretoras de pepsina y HCl del proventrículo, que fueron sustituidas por células columnares de recubrimiento que normalmente tapizan las cisternas colectoras de las glándulas proventriculares como se indica en el **Cuadro 7** En el estroma intersticial adyacente a la metaplasia epitelial, fue observada infiltración de células linfoides de tamaño y morfología heterogénea. Tanto la metaplasia como la infiltración linfoide semejantes a las observadas en el presente estudio, han sido asociadas a "Proventriculitis viral transmisible" de etiología aún no determinada, en la que han sido involucrados agentes virales (adenovirus, poliomavirus y reovirus) (**Goodwin y Hafner**, 1997). En el presente estudio no fue descartada la presencia de

dichos virus, ni el posible efecto de poliaminas y tampoco fue comprobada la interacción de la SBA con las estructuras tisulares de los órganos gástricos del pollo de engorda. La severidad de todas las lesiones microscópicas observadas, resultó ser variable y no se incrementó en forma lineal a medida que fue mayor la inclusión de SCI en la dieta. Esto pudiera deberse, a la individualidad de la respuesta orgánica de cada sujeto ante los diversos agentes y factores patógenos. Sin embargo, la severidad del daño total en el proventrículo constituida por la suma de las lesiones evaluadas, se vió incrementada a medida que aumentó % de SCI en la dieta como puede ser observado en el **Cuadro 7**.

Análisis de duodeno e intestino medio

En presencia de SBA en el citoplasma de los enterocitos, el efecto mitogénico de la SBA que induce a hiperplasia fue comprobado al verse incrementada ($P \leq 0.001$) en duodeno, 6.8 la cantidad de mitosis por cripta conforme a la ecuación $Y = 19.91 + 0.34 S$ siendo $R^2 = 0.5876$ y en intestino medio, 1.3 mitosis por cripta conforme a la ecuación $Y = 15.58 + 0.065 S$ siendo $R^2 = 0.0981$ (**Cuadros 11 y 12**). Este incremento de mitosis a medida que fue mayor la inclusión de SCI en la dieta, prueba que la SBA tiene el mismo efecto patógeno para las aves que el señalado en ratas con otros tipos de lectina (**Sotelo y col.**, 1983; **Grant y col.**, 1987; **Calderon de la Barca y col.**, 1988; **Pusztai**, 1991).

Al análisis histológico se apreció que la hiperplasia epitelial provocó repliegues del epitelio confirmando a las vellosidades, el aspecto de ramas de helecho (**Fig. 7**). Como puede ser observado en la **Fig. 8**, en las protuberancias del epitelio, fueron observadas numerosas células sobrepuestas resultantes probablemente, por el estímulo proliferativo excesivo a causa del efecto aditivo de las poliaminas inducidas por SBA **Pusztai y col.** (1988); **Grant y col.** (1990) y **Bardocz y col.** (1995) y de las sintetizadas fisiológicamente por ODC y AdoMetDC (**Morgan y Darling**, 1993). En cambio, en las depresiones del cordón epitelial, las células fueron escasas debido probablemente, al efecto inhibitor compensatorio de la espermidina/esparmina N^1 -acetiltransferasa (SSAT), enzima que destruye las poliaminas y de la 26S proteasa que interfiere con la síntesis de ODC y AdoMetDC (**Coffino**, 2001; **Suzuki y col.**, 1994). El epitelio de la vellosidad, se muestra rectilíneo con una sola hilera de células cuboidales cuando los procesos anabólicos y catabólicos se llevan a cabo en forma armónica (**Hodges**, 1974 y **McLelland**, 1979).

En el presente estudio, aunque el incremento de mitosis por cripta fue lineal, en la histopatología el aspecto de helecho (hiperplasia), fue apreciado solo con concentraciones de SBA en la dieta de entre 884 $\mu\text{g/g}$ y 2 747 $\mu\text{g/g}$ es decir en los tratamientos 0%, 20%, 40% y 60%. En cambio, en los tratamientos 80% y 100% en los que la concentración de SBA fue de 3 196 $\mu\text{g/g}$ y 3 667 $\mu\text{g/g}$, el aspecto de helecho desapareció casi por completo y la hiperplasia fue sustituida por displasia en todo el epitelio incluso en el ápice de las vellosidades, en donde no se presentó la descamación celular fisiológica (**Fig. 9, 10, 11,12**). La displasia en estos dos tratamientos, se caracterizó por sobreposición desordenada de numerosas células con incremento en la relación núcleo citoplasma, núcleos ovales o redondos de tamaño variable pero en ocasiones enormes, cromatina dispersa e hipercromática y con uno o dos nucleolos grandes muy aparentes (**Jones y col., 1997 y Cheville, 1999**) (**Fig. 13**). La displasia es producto de proliferación celular atípica e irregular por lo que las células pierden la orientación normal, se altera su tamaño, forma, volumen y apetencia tintórea de sus núcleos. Se considera que esta lesión es reversible pero en ciertos casos, ha sido apreciada como precursoras de procesos neoplásicos (**Jones y col., 1983 y Cheville, 1999**).

La desaparición del aspecto de helecho de las vellosidades sugiere, que el estímulo mitogénico en concentraciones mayores a 3 000 $\mu\text{g/g}$ de SBA en la dieta provocó un estímulo tan pronunciado que no fue controlado por los procesos antagónicos que mantienen la homeostasis de la proliferación celular. La presencia de displasia en estas circunstancias, es explicable debido al posible papel que han demostrado jugar las concentraciones elevadas de poliaminas en el desarrollo de tumores y su transformación a fenotipos malignos (**Notarnicola y col., 2003**)

Fue observado además que el tamaño de las vellosidades en duodeno disminuyó 105.4 μm conforme a la ecuación $Y = 2064.35 - 5.27 S + 0.04 S^2$ siendo $R^2 = 0.0632$ mientras que en intestino disminuyó 53.2 μm conforme a la ecuación $Y = 1063.45 - 2.66 S$ siendo $R^2 = 0.2054$ (**Cuadros 11 y 12**).

Esta atrofia de las vellosidades cada vez mayor, a medida que se incrementó la concentración de SBA en la dieta coincide con el efecto de otras lectinas observado en ratas con esta o con otros tipos de lectina (**Sotelo y col., 1983; Grant y col., 1987; Calderon de la Barca y col., 1988; Pusztai, 1991**). No ha sido explicado aún, por qué el consumo de lectinas provoca atrofia de las vellosidades a pesar de que induzca a la vez, hiperplasia del epitelio.

Estos dos procesos parecen contradictorios. Al igual que en la histología de proventrículo, la severidad de las demás lesiones microscópicas evaluadas en duodeno intestino, resultó ser variable y no se incrementó en forma lineal a medida que fue mayor la inclusión de SCI en la dieta. Esto pudiera deberse a la individualidad de la respuesta orgánica de cada sujeto ante los diversos agentes y factores patógenos (**Cuadros 8, 9 y 10**).

Microscopía electrónica de duodeno

Con microscopía electrónica, fue observada hinchazón de las mitocondrias, fragmentación y degeneración vacuolar del retículo endoplásmico pero no se apreció ruptura ni desorganización de las microvellosidades salvo en el ápice de las vellosidades tal como ha sido señalado (**Sotelo y col., 1983 y Pusztai, 1991;**) (**Fig. 14, 15, 16, y 17**). La descamación epitelial en el ápice de las vellosidades intestinal es normal y resulta de la citocinesis celular (**Humphrey y Turk, 1974; Bjerknes y Cheng, 1999**). La ausencia de alteraciones en las microvellosidades que ha sido observada en ratas por efecto de una gran variedad de lectinas (**Sotelo y col., 1983 y Pusztai, 1991**) pudo deberse al grado de toxicidad de la SBA de la variedad de soya utilizada. **King y col., (1980)** y **King y col., (1981)** observaron que la variedad "Processor" de *Phaseolus vulgaris* provocó ruptura y desorganización de las microvellosidades en toda la superficie de las vellosidades salvo a nivel de las criptas en intestino de ratas, mientras que, la variedad "Pinto III" que resultó menos perjudicial no provocó ninguna alteración. **Hart y col., (1988)** encontraron que las lectinas que interactuaron específicamente con galactosa, glucosa, manosa y N-acetilgalactosamina no tuvieron efecto sobre las microvellosidades. La hinchazón de las mitocondrias con lisis de la matriz y de las crestas y de presencia de gránulos electrodensos, denota daño con la consecuente incapacidad para producir ATP (**Cheville, 1994**). Los gránulos electrodensos en las mitocondrias que son menos frecuentes en aves que en mamíferos (**Humphrey y Turk, 1974**), corresponden a partículas de calcio secuestradas a consecuencia de un desequilibrio de Ca^{++} (**Cheville, 1994**).

Páncreas

La hipertrofia nodular, parénquima blanco y aspecto punteado del parénquima del páncreas, fue evidente a partir del tratamiento con 60% SCI que contenía 2747 μ g de SBA por gramo de alimento ($p < 0.01$). Sin embargo, esta lesión fue observada sólo en una ave en los tratamientos 60% y 80% SCI y en seis aves del tratamiento 100% SCI (**Cuadro 6**) (**Fig.18**). El color blanco y el aspecto punteado del páncreas, no han sido reportados. En el presente

trabajo, estas lesiones fueron observadas íntimamente relacionadas con la hipertrófia nodular del parénquima.

La hipertrofia del páncreas ha sido atribuida al efecto de los factores antitripsicos y no al de la SBA (**Applegarth y col.**, 1964; **Balloun**, 1980; **Monari**, 1992). Sin embargo, la concentración elevada de poliaminas debido al efecto de la SBA, podría estar también implicada en el crecimiento del páncreas. En otros modelos experimentales, solo el 10% de las poliaminas exógenas administradas por vía oral permanecieron en el tejido intestinal. La mayor parte de las poliaminas suministradas, desaparecieron del intestino al cabo de la primera hora y fueron distribuidas en los demás tejidos del cuerpo. El crecimiento del páncreas debido a las lectinas estuvo íntimamente relacionado con el metabolismo e incremento de la concentración de poliaminas y con la liberación de CCK que estas inducen a nivel intestinal. Por lo que, el proceso bioquímico del crecimiento del páncreas mediado por lectinas, parece ser en parte diferente al provocado por los inhibidores de la tripsina de la soya aunque en este último también esté involucrada la CCK (**Pusztai**, 1991; **Pusztai y Bardocz**, 1996).

La extensión de las áreas en las que fue observado la ausencia de gránulos de zimógeno en la luz de los acinis, se incrementó ($P \leq 0.05$) a medida que aumentó el % de inclusión de SCI mientras que, la degeneración vacuolar se presentó en todos los tratamientos con severidad semejante, como puede ser observado en el **Cuadro 13**. Estos resultados, coinciden con los obtenidos por **Applegarth y col.** (1964) en aves Leghorn alimentadas con SCI. Las áreas de degeneración y necrosis del epitelio exocrino sin reacción inflamatoria, a partir de 60% de inclusión de SCI, no han sido referidas en relación con el efecto del consumo de SCI, pero sí ha sido observada por deficiencia de selenio en aves que desarrollaron "Síndrome de mala absorción" (**Sinclair y col.**, 1984).

CONCLUSIONES

1. La inclusión de porcentajes crecientes de SCI en la dieta, no se vió reflejada en la frecuencia ni en la severidad de las lesiones macroscópicas y microscópicas observadas en proventrículo, molleja e intestino ya que estas resultaron ser variables y no se incrementaron en forma lineal a medida que aumentó el % de inclusión de SCI en la dieta.
2. La inclusión de 40% o más de SCI en la dieta o con 2 447 μg de SBA / g de alimento o más, estuvo asociada al desarrollo de hipertrofia nodular, color blanco y aspecto punteado del páncreas que fueron observados a simple vista.
3. El efecto de la interacción de SBA con la membrana y su presencia en el citoplasma de los enterocitos de pollo, fue semejante al de otras lectinas en otros modelos experimentales. Esta interacción se vió asociada a atrofia de las vellosidades e hiperplasia de enterocitos y de células caliciformes evidenciada por aumento lineal de mitosis y a displasia epitelial a partir de 3 196 μg y hasta 3 667 μg de SBA por gramo de alimento. Ultraestructuralmente, el efecto de la SBA en los enterocitos de duodeno, se vió asociado a tumefacción y citolisis de las mitocondrias y a degeneración vacuolar del retículo endoplásmico que son alteraciones potencialmente letales para las células y que reflejan disfunciones severas, que comprometen la última etapa de la digestión y la absorción de nutrientes y la viabilidad de las células epiteliales.

LITERATURA CITADA

- Applegarth, A.; Furuta, F.; Lepkovsky, S. Response of the chicken pancreas to raw soybeans. *Poult. Sci.* **1964**; 43:733-73.
- Balloun S.L. Soybean meal in poultry nutrition. Edited by Kenneth C. And M.S. Lepley. American Soybean Association. The Ovid Bell Press, Inc., Foulton, St Louis M.O. USA. **1980**.
- Bardocz, S.; Grant, G.; Ewen, S.W.B.; Duguid, T.J.; Brown, D.S.; Englyst, K. Pusztai, A. Reversible effect of phytohaemagglutinin on the growth and metabolism of rat gastrointestinal tract. *Gut*, **1995**; 37:353-360.
- Bermudez, A.J.; Firman, J.D. Effects of biogenic amines in broiler chickens. *Avian Dis.* **1998**; 42: 199-203.

- Bielorai, R.; Iosif, B. Amino acid absorption and endogenous amino acids in the lower ileum and excreta of chicks. *J. Nutr.* **1987**; 117:1459-1462.
- Bjerknes, M.; Cheng, H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* **1999**; 116:7-14.
- Calderón de la Barca, A.M.; Vázquez Moreno, L.; Valencia, M.E. The lectin of *Amaranthus cruentus* resists in vivo proteolysis and affects the gastrointestinal mucosa of rats. En Bog-Hansen, T.C.; Freed, D.L.J. (Eds), *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*, Sigma Chemical Chemical Co., St. Louis, MO. USA, **1988**; 6:125-132.
- Cheville, N.F. *Ultrastructural pathology. An introduction to interpretation.* 1^o ed. Iowa State University Press/Ames, Iowa. **1994**.
- Cheville, N.F. Disturbances of cell growth and replication. In: *Introduction to veterinary pathology.* 2^oed., Iowa State University Press/Ames, Iowa. **1999**.
- Coates, M.E.; Hewitt, D. A comparison of the effects of raw and heated soya-bean meal in diets for germ-free and conventional chicks. *Br. J. Nutr.* **1970**, 24, 213-225.
- Coffino, P. Regulation of cellular polyamines by antienzyme. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**; 2: 188-194.
- Dellmann H.D. *Textbook of veterinary histology.* 4th ed., Lea and Febiger, Philadelphia **1993**.
- Duke, G.E. Alimentary canal: Secretion and digestion, special digestive functions, and absorption. In, Sturkie PD. *Avian physiology*, 4th ed.; Springer-Verlag: New York, **1986**.
- Fang, R.; Mantel, M.; Ceri, H.; Characterization of quail intestinal mucin as a ligand for endogenous quail lectin. *Biochem. J.* **1993**; 293: 867-872.
- Goodwin, M.A.; Hafner, S. Transmissible viral proventriculitis . In: *Disease of poultry.* Clanek, B.W.; Barnes, H.J.; Beard, W.Ch; McDougald R.L.; Saif, Y.M. 10th ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa. **1997**.
- Grabarevic, Z.; Tisljar, M.; Dzaja, P.; Artukovic, B.; Sweiwert, S.; Sikiric, F. Stress induced gizzard erosion in chicks. *J. Vet. Med. A.* **1993**; 40: 265-270.
- Grant, G.; Watt, W.B.; Stewart, J.C; Pusztai, A. Effect of dietary soybean (Glycine max) lectin and trypsin inhibitors upon the pancreas of rats. *Med. Sci. Res.* **1987**.15:1197-1198.
- Grant, G.; Bardocz, S.; Brown, D.S.; Watt, W.B.; Stewart, J.C.; Pusztai, A. Involvement of polyamines in pancreatic growth induced by dietary soybean, lectin or trypsin inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* **1990**; 18: 1009-1010.

- Grant, G. Plant lectins. In Secondary Plant Products- Antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Caygill, J.C.; Mueller-Harvey, I. 1^o published, Nittingham, University Press. U.K. 1999.
- Greer, F.; Brewer, A.C.; Pusztai, A. Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. *Br. J. Nutr.* 1985; 54: 95-103.
- Harry, E.G.; Tucker, J.F.; Laursen, J.A.P. The role of histamine and fish meal in the incidence of gizzard erosion and pro-ventricular abnormalities in the fowl. *Br. Poult. Sci.* 1975; 16:69-78.
- Hart, C.A.; Batt, R.M.; Saunders, J.R.; Getty, B. Lectin-induced damage to the enterocytes brush border. An electron microscopic study in rabbits. *Scand. J. Gastroenterol.* 1988; 23(10): 1153-1159.
- Hayat, M.A. Basic techniques for transmission electron microscopy. Academic Press. San Diego and London 1986.
- Heby, O. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 1981; 19: 1-20.
- Herzig, K.H.; Bardocz, S.; Grant, G.; Nustede, N.; Fölsch, U.R.; Pusztai, A. Red kidney bean lectin is a potent cholecystokinin releasing stimulus in the rat inducing pancreatic growth. *Gut* 1997; 41: 333-338.
- Hodges, R.D. The digestive system. In: The histology of the fowl. Academic press, New York. 1974.
- Huff, G.R.; Huff, W.E.; Balog, M.S.; Rath, N.C.; Zheng, Q. Studies on infectious proventriculitis. 32th National Meeting on Poultry Health and Processing. Ocean City Maryland USA. 1997; 39-43.
- Humphrey, C.D.; Turk, D.E. Ultrastructure of normal chicks intestinal epithelium. *Poult. Sci.* 1974; 53: 990-1000.
- Johnson, L.R.; Brockway, P.D.; Madsen, K.; Hardin, J.A.; Gall, D.C. Polyamines alter intestinal glucose transport. *Am. J. Physiol. Gastrointestinal Liver Physiol* 1995; 268: 416-423.
- Jones T.C., R.D. Hunt, and N.W. King. Veterinary pathology. 6^{ed}, Williams & Wilkins, Baltimore, 1997.

- Jordinson, M.; Playford, R. J.; Calam, J. Effects of a panel of dietary lectins on cholecystokinin release in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* **1997**; 273: 946-950.
- King, T.P.; Pusztai, A.; Clarke, M.W. Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin induced lesions in rat small intestine: light microscope studies. *J. Comp. Path.* **1980**; 90: 585-595.
- King, T.P.; Pusztai, A.; Clarke, E.M.W. Electron microscope immunochemistry of kidney bean poisoning in rats. *Micron* **1981**; 12: 191.
- Luna, L.G. Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed.; American Registry of Pathology; McGraw-Hill: New York, **1968**.
- Martinez, V.; Rodríguez-Membrilla, A.; Jiménez, E.; Goñalons, E.; Vergara, P. Immunohistochemical differentiation of gastrin and cholecystokinin in gastrointestinal tract of chickens. *Poult. Sci.* **1993**; 72: 2328-2336.
- McLelland, J. Digestive system. In: Form and function in birds. King A. S. and McLelland, J. eds. Academic Press, New York. **1979**.
- Mayer, F. Methods in microbiology, vol. 20: *Electron Microscopy* in microbiology. Academia Press, London **1988**.
- Monari, S. Fullfat soya handbook. American Soybean Association; Center International Rogier- Box 521; 1210 Brussels **1992**.
- Morgan, S.J.; Darling, D.C. Animal cell culture. Bios. Scientific Publishers Limited, St. Thomas House, Becket Street, Oxford **1993**.
- Notarnicola, M., Linsalata, M.; Caruso M.G.; Caruso, M.L.; Altomare, D.; Lorusso, D.; Leo, S.; Di Leo, A. Genetic and biochemical changes in colorectal carcinoma in relation to morphologic characteristics. *Oncology reports* **2003**; 10: 1987-1991.
- Ortiz, R.; Sanchez, R.; Páez, A.; Montañó, L.F.; Zenteno, E. Induction of Intestinal Malabsorption Syndrome in Rats Fed with *Agaricus bisporus* Mushroom Lectin. *J. Agric. Food Chem.*, **1992**; 40: 1375-1378.
- Paniagua, R.; Nistal, M.; Sesma, P.; Álavarez- Uría, M.; Fraile, B.; Amadón, R.; Sáez, F.J. Biología celular. 2^a ed., Mc Graw- Hill- Interamericana de España, **2003**.
- Pusztai, A.; de Oliveira, J.T.A.; Bardocz, S.; Grant, G. Dietary Kidney bean lectin-induced hyperplasia and increased polyamine content of the small intestine. En Bog-Hansen,

- T.C.; Freed, D.L.J. (Eds), Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry, "Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA, **1988**; 6:117-120.
- Pusztai, A. Plant lectins, Cambridge, EDS.; Cambridge University Press: Cambridge, **1991**.
- Pusztai, A.; Bardocz, S. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. *Trends Glicosci. Glucotechnol.* **1996**; 8: 146-165.
- Riddell, C. Avian Pathology. 2° ed. American Association of Avian Pathologists. **1996**.
- Rosselot, G.; López-Lastra, M.; McMurtry, J.P. Determination of gizzerosine activity in fish meal with a homologous radioimmunoassay. *Poult. Sci.* **1995**; 75: 873-880.
- SAS Institute Inc. SAS / STAT version 8 Cary, NC. **1999**.
- Siegle, H.S.; Cruse, C.J.; Nimz, Ch.; Leeson, S. Symposium: The avian gastrointestinal tract and digestion. *Poult. Sci.* **1982**; 61: 1225-1272.
- Sinclair, A.J.; Embury, D.H.; Smart, I.J. Barr, D.A.; Reece, R.L.; Hooper, P.T.; Gould, J.A. Pancreatic degeneration in broiler with runting and stunting syndrome. *Vet. Rec.* **1984**; 115: 485-488.
- Sotelo, A.; González L.A.; González, G.M.T.; Velasco, E., Feria, V.A. Ultrastructural changes of epithelial intestinal cells induced by the ingestion of raw *Phaseolus acutifolius*. *Nutrition Reports International* **1983**; 27: 329-337.
- Suzuki, T.; He, Y.; Kashiwagi, K; Murakami, Y. Antienzyme protects against abnormal accumulation and toxicity of polyamines in ornithine decarboxylase overproducing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**; 91: 8930-8934.
- Tabor, C.W.; Tabor, H. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* **1984**; 53: 149-790.
- Thomas, T.; Thomas, T.J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic application. *Cell Mol. Life Sci.* **2001**; 58: 244-258.

Cuadro 3. *Criterios para severidad de lesiones microscópicas consideradas en proventrículo*

MUCOSA	Leve = 1	Moderado = 2	Severo = 3
1. Hiperplasia celular (Ondulación del epitelio)	Poca cantidad	Moderada cantidad	Abundante cantidad
2. Infiltración linfoide (difusa en mucosa)	Poca cantidad	Moderada cantidad	Abundante cantidad
3. Nódulos linfoides (Esféricos y con limite fibroso)	1 por corte	3 por corte	Más de 4 por corte
4. Infiltración granulocitosis (en mucosa)	Pocos - dispersos	2 focos	3 o más focos
5. Hemorragias	1-2 pequeñas (2-3 eritrocitos)	3 -4 pequeñas o tamaño moderado	Más de 4 grandes
6. Exudado seroso (Con leucocitos en A.- En submucosa; B.- interglandular)	Poca cantidad solo en A	Moderada cantidad solo en A	Abundante o moderada cantidad En A y en B
PARÉNQUIMA	Leve = 1	Moderado = 2	Severo = 3
1. Fibrosis (En A.- en sub-epitelio de cisterna; B.- interglandular)	Poca en A	Moderada en A y B	Abundante en A, en B y en parénquima
2. Metaplasma epitelial (Extensión en A.- parénquima; B.-cerca de la luz cisterna)	Poca en B	Moderada en B	Mayor en A y B
3. Dilatación glandular (de cisterna con atrofia de párenquima)	En una glándula	En 2-3 glándulas	En más de 3 glándulas
4. Adenitis no supurativa (Acúmulos linfoides intersticiales)	1 pequeño	2 a 3 pequeños o tamaño moderado	Más de 4
Daño total	Suma de los valores promedio de todas las lesiones / tratamiento		

Cuadro 4. Criterios para severidad de lesiones microscópicas consideradas en duodeno e intestino medio

MUCOSA	Leve = 1	Moderado = 2	Severo = 3
1. Hiperplasia de enterocitos (Ondulación del epitelio)	En 2 vellosidades	En 4 - 6 vellosidades	Abundantes en más de 6 vellosidades
2. Hiperplasia de células caliciformes	Abundantes en 2 - 3 vellosidad	Abundantes en más de 3 vellosidad	Abundantes en más de vellosidades
3. Infiltración linfoide (A. en íntima; B. en lámina propia)	Pocos en A de 1 - 3 vellosidades	Moderada cantidad en B pocos en A	Abundantes en A y B de varias vellosidades
4. Nódulos linfoides (Esféricos y con limite fibroso)	1 - 2	2 - 3	Más de 3
5. Infiltración granulocitos (Acúmulos en lámina propia o en la íntima)	1-2 con 7 - 10 granulocitos	2-3 con más de 10 granulocitos	Más de 3 con incontables granulocitos
6. Hemorragias (A.- en ápice de vellosidades; B.- en varias localizaciones)	2-4 pequeñas en A.	Más de 4 pequeñas en A	Más de 4 extensas en B
7. Edema subepitelial (Espacio subepitelial sin leucocitos)	Pequeño en 2 - 3 vellosidades	Moderado en 5 vellosidades	Amplios en varias vellosidades
8. Criptas quísticas	1 - 2	3 - 4	Más de 4
Daño total	Suma de los valores promedio de todas las lesiones / tratamiento		

Cuadro 5. Criterios de lesiones microscópicas consideradas en páncreas

PARÉNQUIMA	Leve = 1	Moderado = 2	Severo = 3
1) Ausencia de zimógeno (Grupos de acinis)	2-3 pequeños	2-3 de tamaño moderado	Amplias y con aspecto adenomatoso.
2) Nódulos linfoides (Esféricos y con límite fibroso)	1 acúmulo linfoide	2 - 3 acúmulos linfoides	Más de 3 acúmulos linfoides
3) Degeneración vacuolar (Áreas de parénquima)	1 - 2 Pequeñas áreas de hasta 3 vacuolas	1 -2- de más de 6 vacuolas	Más de 3 áreas con incontables vacuolas.
4) Necrosis (Áreas de parénquima)	1 - 2 pequeñas	2 - 3 amplias	Más de 3 amplias

Cuadro 6. Lesiones macroscópicas gastro-entéricas de pollos de engorda de 42 días de edad (porcentaje de presentación por tratamiento).

LESIONES	DIETAS EXPERIMENTALES					
	0% ¹	20%	40%	60%	80%	100%
PROVENTRÍCULO						
Ausencia papilas ($P \leq 0.05$) *	60 a	42 ab	48 a	42 ab	0 c	12 bc
Dilatación gástrica	0	23	0	42	18	18
Hemorragias en mucosa	0	0	0	0	0	0
Glándulas quísticas	23	12	0	0	0	0
MOLLEJA						
Queratolisis en límite ístmico	67	78	78	48	55	42
Úlceras en capa de queratina	72	78	60	90	72	90
Úlceras en límite ístmico	0	12	23	48	30	23
Queratolisis difusa	12	18	0	12	0	0
Dilatación	0	60	30	42	18	18
DUODENO						
Partículas alimento ($P \leq 0.01$) *	67 a	55 ab	35 b	53 ab	42 ab	78 a
Hiperemia de mucosa	0	0	0	0	0	0
Hemorragias	12	0	0	0	0	0
YEYUNO E ILEON						
Partículas alimento	90	90	90	90	90	90
Hiperemia de mucosa	0	0	0	0	0	0
Hemorragias	0	0	0	0	0	0
PÁNCREAS						
Hipertrofia nodular ($P \leq 0.01$) *	0 b	0 b	0 b	12 b	12 b	60 a
Parénquima blanco ($P \leq 0.01$) *	0 b	0 b	0 b	12 b	12 b	60 a
Aspecto punteado ($P \leq 0.01$) *	0 b	0 b	0 b	12 b	12 b	60 a

¹ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. Diferentes literales en filas correspondientes a lesiones con *, señalan diferencias estadísticas con $P \leq 0.01$ ó $P \leq 0.05$ según el tipo de lesión. Lesiones sin asterisco la $P \geq 0.05$.

Cuadro 7. Severidad media por tratamiento de las lesiones microscópicas del proventrículo de pollos de engorda de 42 días de edad (medias por tratamiento).

LESIONES	DIETAS EXPERIMENTALES					
	0% ¹	20%	40%	60%	80%	100%
MUCOSA						
Hiperplasia celular *	1.87 b	1.88 b	2.12 a	2.06 a	2.17 a	1.78 b
Infiltración linfoide	2.19	1.99	2.04	2.26	2.22	2.43
Nódulos linfoides *	2.12 b	2.01 b	2.30 b	2.30 b	2.81 a	2.87 a
Infiltración granulocitos *	1.64 b	1.73 b	2.37 a	1.97 b	2.19 a	2.39 a
Hemorragias	1.88	1.68	1.77	1.93	2.19	2.06
Atrofia	1.04	0.52	0.79	0.66	0.72	1.29
Exudado seroso	2.14	2.08	2.06	2.22	1.75	2.48
PARÉNQUIMA						
Fibrosis *	1.00 b	1.39 b	1.67 b	2.00 a	1.92 a	2.36 a
Metaplasia epitelial *	0.89 b	0.67 b	0.94 b	1.11 a	1.33 a	0.79 b
Dilatación glandular *	0.94 b	0.44 b	1.17 b	1.50 a	1.36 a	1.67 a
Adenitis no supurativa *	1.17 b	1.56 b	1.83 a	1.50 b	1.58 b	1.06 b
Daño Total *	16.88 b	15.95 b	19.06 a	19.51 a	20.24 a	21.18 a

¹ Porcentajes de sustitución de proteína PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. Diferentes literales en filas correspondientes a lesiones con *, señalan diferencias estadísticas con $P \leq 0.05$. Lesiones sin asterisco la $P \geq 0.05$.

Cuadro 8. Severidad de las lesiones microscópicas en mucosa del duodeno de pollos de engorda de 42 días de edad (medias por tratamiento).

LESIONES	DIETAS EXPERIMENTALES					
	0% ¹	20%	40%	60%	80%	100%
Hiperplasia de enterocitos ($P \leq 0.01$)*	2.08 a	1.69 ab	1.50 b	1.92 a	1.64 ab	1.78ab
Hiperplasia de caliciformes ($P \leq 0.05$)*	0.17 c	0.42 cb	0.78 b	1.94 a	2.28 a	1.72 a
Infiltración linfoide ($P \leq 0.01$) *	1.08 a	0.89 ab	1.17 a	0.78 ab	0.94 ab	0.69 b
Nódulos linfoides	0.00	0.44	0.19	0.11	0.06	0.14
Granulocitos. ($P \leq 0.05$) *	0.67 a	0.39 ab	0.61 a	0.25 ab	0.64 a	0.19 b
Hemorragias	0.97	1.06	0.83	0.86	1.00	1.28
Edema subepitelial ($P \leq 0.05$)*	1.17 a	0.64 ab	0.39 b	0.36 b	0.69 ab	0.39 b
Críptas quísticas	0.03	0.11	0.08	0.03	0.00	0.08
Críptas purulentas	0.00	0.19	0.19	0.33	0.19	0.00
Daño Total ($P \leq 0.05$)	6.17 b	5.83 b	5.74 b	6.58 ab	7.44 a	6.27 b

¹ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. Diferentes literales en filas correspondientes a lesiones con *, señalan diferencias estadísticas con $P \leq 0.01$ ó $P \leq 0.05$ dependiendo del tipo de lesión. Lesiones sin asterisco la $P \geq 0.05$.

Cuadro 9. Severidad de las lesiones microscópicas del intestino medio de pollos de engorda de 42 días de edad (medias por tratamiento).

LESIONES	DIETAS EXPERIMENTALES					
	0% ¹	20%	40%	60%	80%	100%
Hiperplasia de enterocitos ($P \leq 0.05$)*	1.09 b	0.94 b	1.61 a	2.17 a	1.72 a	2.08 a
Hiperplasia de células caliciformes	1.14	1.22	1.17	1.00	1.56	0.83
Infiltración linfoide	0.79	1.17	1.06	1.22	0.78	1.60
Nódulos linfoides	0.22	0.28	0.22	0.33	0.22	0.57
Granulocitos	0.00	0.17	0.83	0.78	0.11	0.15
Hemorragias	1.29	1.28	1.67	0.72	0.61	1.27
Edema subepitelial	0.39	0.44	0.22	0.33	0.44	0.67
Daño Total ($P \leq 0.05$)*	4.92 b	5.5 b	6.78 a	6.55 a	5.44 b	7.17 a

¹ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. Diferentes literales en filas correspondientes a lesiones con *, señalan diferencias estadísticas con $P \leq 0.05$ dependiendo del tipo de lesión. Lesiones sin asterisco la $P \geq 0.05$.

Cuadro 10. Lesiones microscópicas de todo el intestino de pollos de engorda de 42 días de edad, que mostraron diferencias (medias por tratamiento).

LESIONES		DIETAS EXPERIMENTALES					
		0% ¹	20%	40%	60%	80%	100%
Hiperplasia enterocitos	Duodeno**	2.08 a	1.69 ab	1.50 b	1.92 a	1.64ab	1.78ab
	Intestino*	1.09 b	0.94 b	1.61 a	2.17 a	1.72 a	2.08 a
Hiperplasia caliciformes	Duodeno*	0.17 c	0.42 c	0.78 b	1.94 a	2.28 a	1.72 a
	Intestino	1.14	1.22	1.17	1.00	1.56	0.83
Infiltración linfoide	Duodeno**	1.08 a	0.89 ab	1.17 a	0.78 ab	0.94ab	0.69 b
	Intestino	0.79	1.17	1.06	1.22	0.78	1.60
Granulocitos	Duodeno*	0.67 a	0.39 ab	0.61 a	0.25 ab	0.64 a	0.19 b
	Intestino	0.00	0.17	0.83	0.78	0.11	0.15
Edema subepitelial	Duodeno*	1.17 a	0.64 ab	0.39b	0.36 b	0.69ab	0.39 b
	Intestino	0.39	0.44	0.22	0.33	0.44	0.67
Daño Total	Duodeno*	6.17 b	5.83 b	5.74 b	6.58 b	7.44 a	6.27 b
	Intestino*	4.92 b	5.5 b	6.78 a	6.55 a	5.44 b	7.17 a

¹ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. Diferentes literales en filas correspondientes a lesiones con *, señalan diferencias estadísticas con una $P \leq 0.01$ ** o bien de $P \leq 0.05$ * dependiendo del tipo de lesión. Lesiones sin asterisco la $P \geq 0.05$.

Cuadro 11. Medias de cantidad de mitosis por cripta y largo de vellosidades en duodeno e intestino medio de pollos de 42 días de edad.

Dietas ¹	Cantidad de mitosis por cripta		Largo de vellosidades	
	Duodeno ²	Intestino medio	Duodeno ³	Intestino medio
	media ± EE	media ± EE	media ± EE	media ± EE
0%	20.95 ± 2.17 e	13.94 ± 1.60 c	2053.48 ± 30.67 a	1028.87 ± 14.60 a
20%	28.05 ± 2.61 de	19.33 ± 1.60 b	1983.90 ± 28.91 a	1072.88 ± 13.75 b
40%	33.17 ± 2.61 cd	18.72 ± 1.60 b	1907.46 ± 25.44 b	928.75 ± 14.20 c
60%	36.39 ± 2.61 c	17.55 ± 1.60 b	2005.16 ± 31.19 a	892.28 ± 13.40 cd
80%	46.40 ± 2.71 b	21.44 ± 1.60 ab	1829.39 ± 29.03 c	859.28 ± 15.00 d
100%	60.24 ± 2.91 a	22.05 ± 1.60 a	2046.50 ± 37.93 a	797.22 ± 14.10 e
$P \leq$ ⁴	***	***	***	***

¹ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. ² Media por tratamiento de la cantidad de mitosis por cripta en duodeno e intestino medio ± error estandar en 10 criptas por pollo a los 42 días de edad. ³ Media por tratamiento del largo de 10 vellosidades de duodeno e intestino medio ± error estandar, por pollo a los 42 días. ⁴ Significancia del efecto *** $P \leq 0.001$. Valores en la misma columna con diferente literal son diferentes.

Cuadro 12. Cuadrados medios de cantidad de mitosis por cripta y largo de vellosidades en duodeno e intestino medio de pollos de 42 días de edad.

Dietas ¹	Cantidad de mitosis por cripta ²						Largo de vellosidades ³					
	Duodeno			Intestino medio			Duodeno			Intestino medio		
	gl ⁴	CM ⁵	P≤ ⁶	gl	CM	P≤	gl	CM	P≤	gl	CM	P≤
Soya	5	2775	***	5	155	**	5	828501		5	1649973	***
Lineal	1	13553	***	1	538	***	1	207668		1	7077727	***
Cuadrático							1	1224485	***			
Residuo	4	81		4	59		3	903450		4	293035	
Error	90	109		102	46		663	99231			30259	

¹ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. ² Cantidad de mitosis de 10 criptas por pollo de duodeno e intestino medio en 9 pollos de 42 días por tratamiento. ³ Largo de 10 vellosidades de duodeno e intestino medio en 9 pollos de 42 días por tratamiento. ⁴ Grados de libertad. ⁵ Cuadrados medios ⁶ Significancia del efecto *** P≤0.001; ** P≤0.01.

Cuadro 13. Severidad de las lesiones microscópicas de páncreas de pollos de engorda de 42 días de edad.

LESIONES	DIETAS EXPERIMENTALES					
	0% ¹	20%	40%	60%	80%	100%
Ausencia de zimógeno *	0.61 b	0.72 ab	0.78 ab	1.00 ab	1.44 a	1.39 a
Nódulos linfoides	1.06	0.67	0.33	0.33	0.72	0.72
Degeneración vacuolar*	0.11 b	0.28 ab	0.28 ab	0.11 b	0.39 a	0.50 a
Necrosis	0.00	0.00	0.06	0.00	0.11	0.22
Fibrosis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17
Daño Total*	2.61 b	1.94 b	1.61 b	2.00 a	3.61 a	4.00 a

¹ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. Diferentes literales en filas, señalan diferencias estadísticas con $P \leq 0.05$ según se indica para cada lesión con *.

Diferentes literales en filas correspondientes a lesiones con *, señalan diferencias estadísticas con $P \leq 0.01$ ó $P \leq 0.05$ según el tipo de lesión. Lesiones sin asterisco la $P \geq 0.05$.

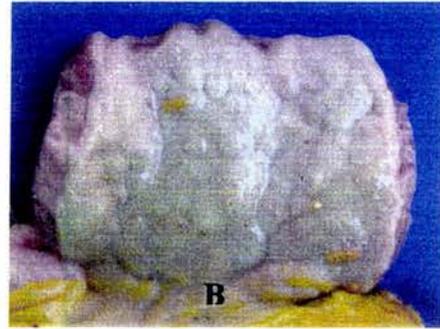
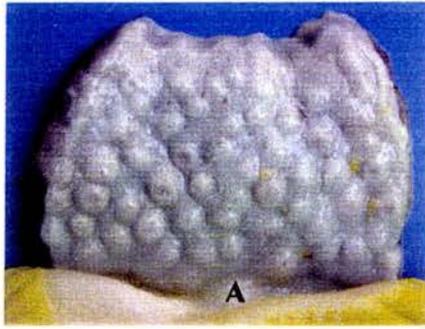


Fig. 1 A.-Papilas normales del proventrículo B.- Ausencia de papilas

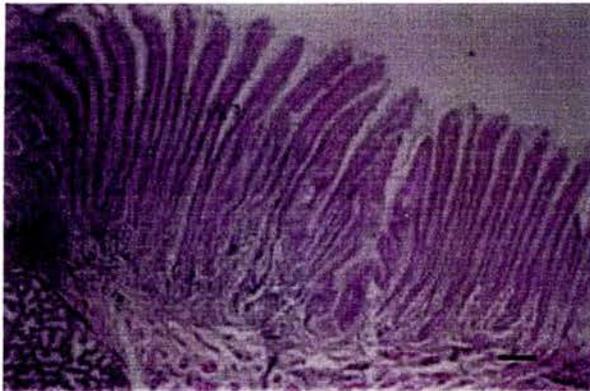


Fig. 2 Mucosa normal de proventrículo (HE).Escala 435 μ m.

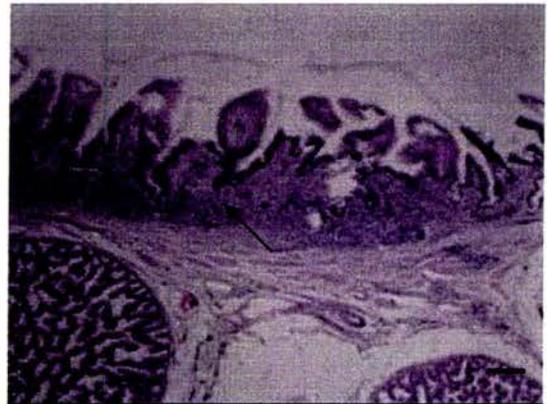


Fig. 3 Atrofia e infiltración leucocitaria severa de la mucosa del proventrículo, que denota inflamación (HE). Escala 435

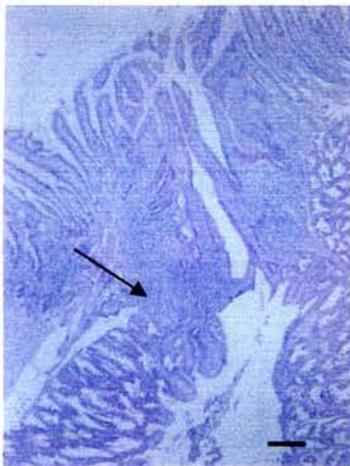


Fig. 4 Meato glandular de proventrículo parcialmente obstruido por infiltración linfoide severa (flecha) e hiperplasia del epitelio (HE). Escala 435 μ m.

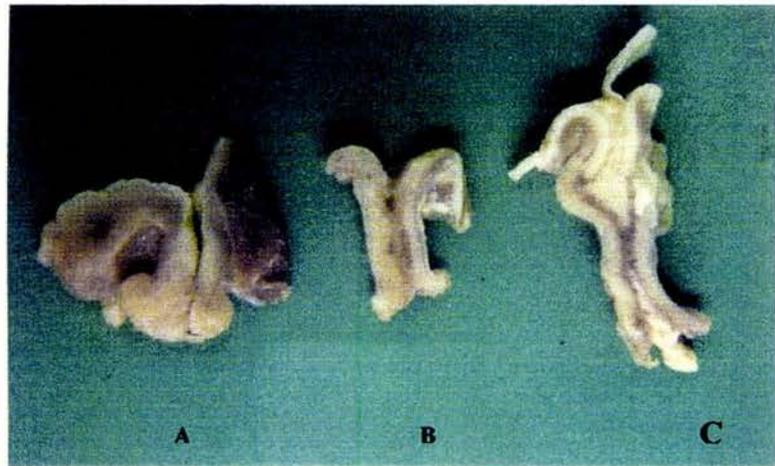


Fig. 5 Conducto entre molleja y duodeno (A) normal; (B) dilatación moderada; (C) dilatación severa.



Fig. 6 Erosión severa y úlceras en la capa de koilin de la molleja de un pollo con 0% de inclusión de SCI en la dieta

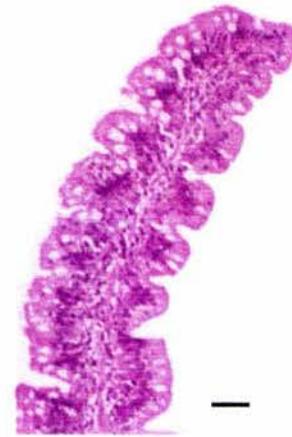


Fig. 7 Hiperplasia severa del epitelio, que le da el aspecto de rama de helecho a la vellosidad de intestino medio (HE).Escala 139 μ m

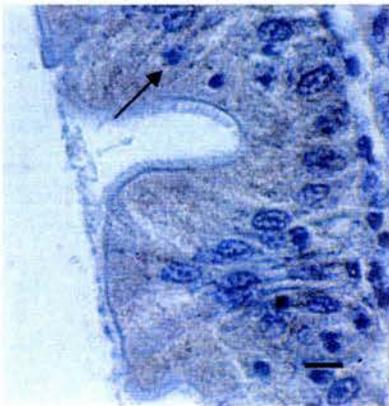


Fig. 8 Hiperplasia y SBA en el citoplasma pero no en microvellosidades (flecha) (EnVision + system). Escala 25 μ m.

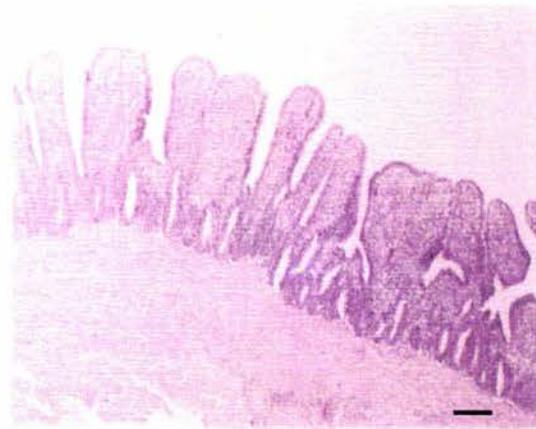


Fig. 9 Atrofia severa de vellosidades de intestino medio (HE). Escala 435 μ m.



Fig. 10 Atrofia severa de vellosidades de intestino medio con displasia del epitelio (HE). Escala 139 μ m.

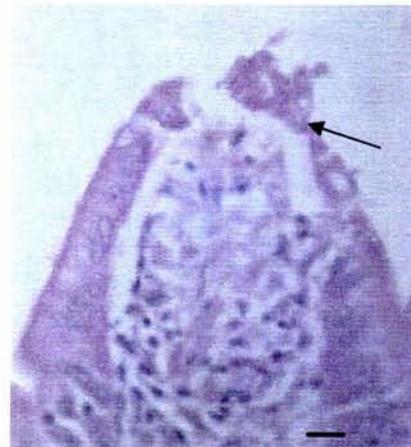


Fig. 11 Descamación normal en ápice de vellosidad de intestinal (flecha) (HE). Escala 35 μ m

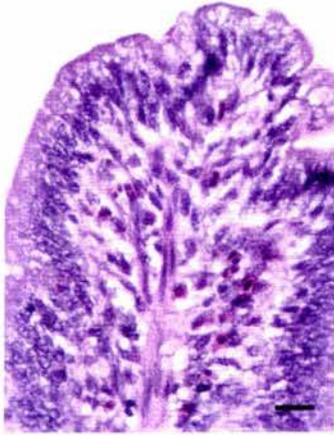


Fig.12 Displasia en ápice de vellosidad (HE). Escala 35 μ m.

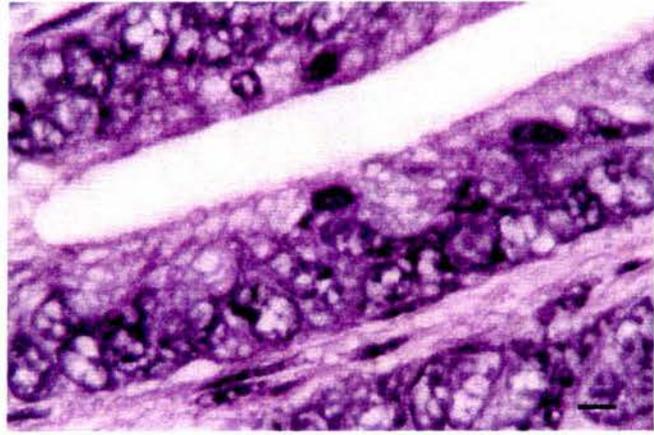


Fig. 13 Hiperplasia severa en cripta de duodeno (HE). Escala 10 μ m.

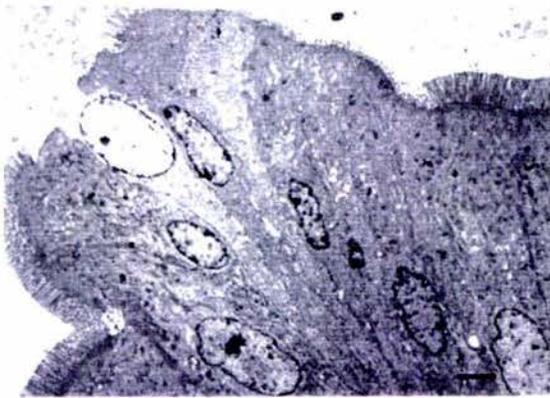


Fig 14 Descamación celular normal en ápice de vellosidad MET. Escala 0.83 μ m.

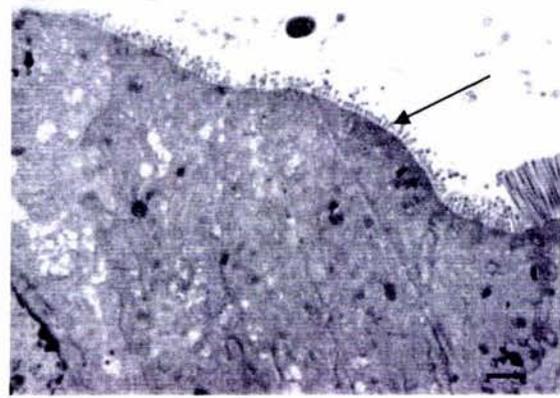


Fig 15 Destrucción y desorganización extensa de las microvellosidades de los enterocitos en proceso de descamación normal, en el ápice de la vellosidad (flecha) MET. Escala 0.4 μ m.

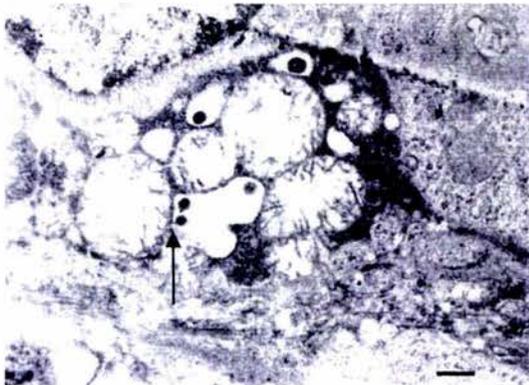


Fig 16 Mitocondrias hinchadas con lisis de la matriz y de las crestas y presencia de gránulos electrodensos (flecha) MET. Escala 0.2 μ m.

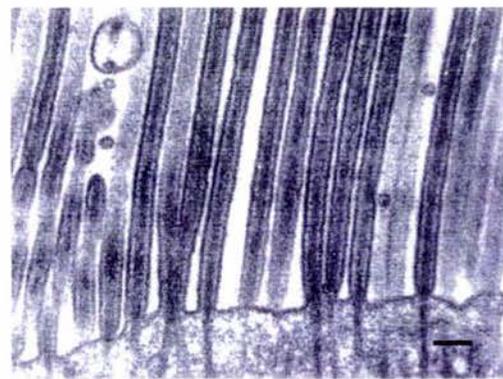


Fig 17 Morfología normal de microvellosidades en su porción basal MET. Escala 0.08 μ m.



Fig. 18 Hipertrofia nodular de páncreas con 80% de SCI en la dieta y 3 196 µg de SBA por gramo de alimento.



Fig. 19 SBA en citoplasma de enterocitos (flecha) (EnVision + system). Escala 35 µm.

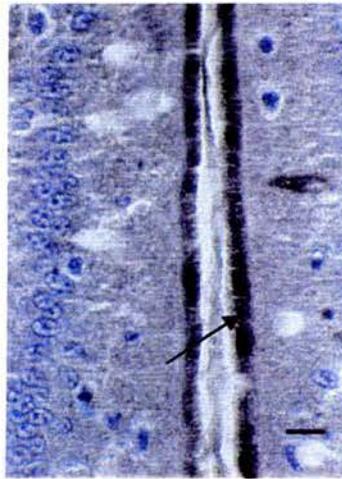


Fig. 20 SBA en microvellosidades (flecha) (EnVision + system). Escala 35 µm.

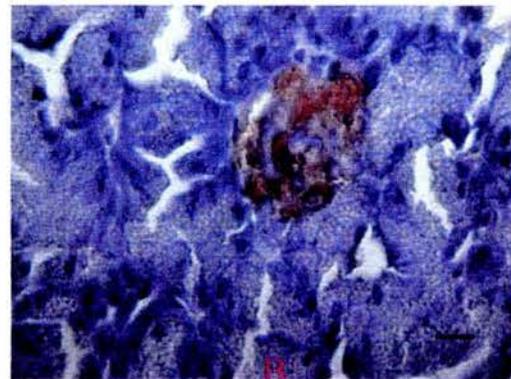
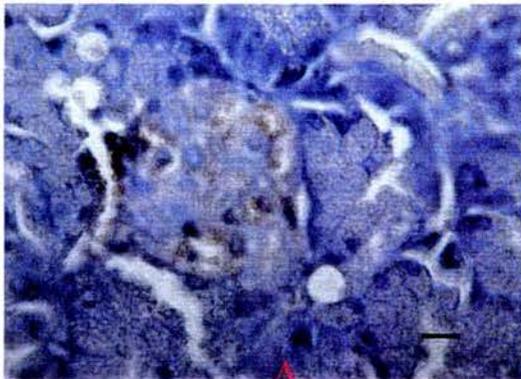


Fig. 21 Escasa SBA en islotes A (glucagón); Abundante SBA en islote B (insulina) y ausencia de SBA en parénquima exócrino de páncreas (EnVision + system). Escala 35 µm.

VII.- INTERACCIÓN DE SBA CON EL EPITELIO INTESTINAL DEL POLLO DE ENGORDA.

INTRODUCCIÓN

Debido a que en el presente trabajo se suministró soya cruda integral que contiene SBA e inhibidores de tripsina, resulta particularmente importante poner de manifiesto la interacción de la SBA con los receptores glucídicos GalNac/Gal, para asociar la presencia de la lectina al efecto en la morfología del epitelio intestinal. Es probable que en las microvellosidades de pollo se encuentre el receptor GalNac/Gal, al igual que muchas otras especies animales. Sin embargo esta interacción no ha sido aún reportada y se ha demostrado que los patrones de enlace de lectinas, la glicosilación y la estructura tridimensional de los glucoconjugados celulares, difieren de una especie a otra e incluso de un sitio a otro de los órganos tubulares de un mismo animal (**Freeman y col.**, 1980; **Suprasert y col.**, 1987; **Damjanov**, 1987). Como resultado de la interacción de las lectinas con sus receptores específicos invariablemente, estas son incorporadas por pinocitosis al citoplasma del enterocito (**Pusztai**, 1991 y **Goldstein y Poretz**, 1986)

El glicocalix, es una capa estática de gel fibroelástico que se extiende sobre la membrana de las microvellosidades. Actúa como una cortina tridimensional que solubiliza y favorece la concentración y el contacto prolongado de nutrientes de gran peso molecular con las microvellosidades, y con los enzimas secretadas por los enterocitos que completan su digestión para poder ser finalmente absorbidos. El glicocalix, resguarda a las enzimas y los productos de la digestión que son particularmente lábiles, del efecto de las enzimas pancreáticas, hepáticas y de los microbios presentes en el lumen (**Moran**, 1996). Está constituido por microfilamentos de actina y otras proteínas y glicoproteínas asociadas, que emergen del interior de las microvellosidades y quedan inmersas en mucina secretada por las células caliciformes, mucopolisacáridos, ácido hialurónico entre otros, enzimas que degradan los elementos de la dieta (ATPasa, dipeptidasa, disacarasa entre otras) y sistemas de transporte que incorporan al citoplasma los productos de la degradación. Las glicoproteínas del glicocalix, provienen del aparato de Golgi en donde los oligosacáridos son incorporados a las proteínas sintetizadas por los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso. Las glicoproteínas, son trasladadas en vesículas a la membrana plasmática y excretadas por exocitosis (**Paniagua y**

col., 2003). Los glicoconjugados unidos covalentemente a proteínas (glicoproteínas) o a lípidos (glicolípidos) de la membrana plasmática, interactúan como receptores de virus, bacterias, parásitos y toxinas entre otros (**Paniagua y col.**, 2003).

La inmunohistoquímica ha sido utilizada ampliamente para explorar diferencias en la glicosilación entre especies, en cuanto a las secuencias de polisacáridos. La inmunohistoquímica, la inmunofluorescencia y la microscopía electrónica, han aportado evidencias de que las lectinas interactúan con la membrana de muchos tipos de células y que son incorporadas al citoplasma de los enterocitos de ratas por medio de endocitosis tras haber interactuado con receptores glucídicos de la membrana de estas células (**Sotelo y col.**, 1983; **Entzian y col.**, 1987; **Calderón de la Barca y col.**, 1987; **Pusztai**, 1991; **Mendez y col.**, 1998; **Goldstein y Poretz**, 1986). Han sido desarrolladas técnicas que amplifican la reacción antígeno anticuerpo, las más utilizadas son la de inmunoperoxidasa y la técnica inmunoenzimática de la biotina-avidina. Esta reacción se ha hecho visible utilizando reveladores que dan color, los más comunes son la diaminobencidina (DAB) que produce un color café y la amino etil carbazol (AEC), la cual tiñe de color rojo. **Heras** (1995) desarrolló un nuevo sistema de detección en inmunohistoquímica que llamaron Envision, basado en un polímero conjugado con la enzima peroxidasa y anticuerpos secundarios, contra inmunoglobulinas de conejo y de ratón, con éste método se tuvo mayor sensibilidad y menos tinción de fondo (DAKO, EnVision + System, Peroxidase (DAB), Rabbit, N° de catálogo K4010).

Para la interpretación de los resultados, hay que considerar las causas de falsos negativos por; anticuerpo inadecuado (por estar caduco, degradado o por dilución inadecuada), pérdida de antígenos, exceso de lavado de la muestra, densidad menor del antígeno en relación con la capacidad de detección. Los resultados falsos positivos, pueden deberse a reactividad cruzada, unión inespecífica con el antígeno buscado, presencia de peroxidasa endógena (**Taylor**, 1978).

HIPÓTESIS

La SBA, de la SCI incluida en las dietas interactuará específicamente con la N-acetil-D-galactosamina del glicocalix y las membranas de los enterocitos del pollo de engorda.

OBJETIVO

Identificar por medio de inmunohistoquímica, la presencia de SBA en los enterocitos de pollos de engorda alimentados durante 42 días con dietas en las que fueron incluidas cantidades crecientes de SCI que contiene SBA.

MATERIAL Y MÉTODOS

La presencia de SBA fue determinada por la técnica indirecta de peroxidasa anti-peroxidasa, diamino bencidina (DAKO). Fueron utilizados cortes histológicos embebidos en parafina de las 2 asas duodenales junto con páncreas de 2 aves e intestino medio de 3 aves de 42 días de edad de cada tratamiento. También fueron utilizados segmentos equivalentes de 3 aves de 21 días, que fueron alimentadas con alimento iniciador; comercial a base de PSD (AC), alimento comercial igual al de AC pero cocido en autoclave (ACA) durante 1 hora a 42 libras de presión y alimento en el que fue sustituido el 100% de la PSD por soya SCI (21SCI). Para los controles negativos, fue utilizado suero de conejo no inmunizado en lugar del anticuerpo primario presente en el suero hiperinmune de conejo anti-SBA obtenido conforme a la metodología descrita anteriormente.

Todo el procedimiento de inmunohistoquímica fue llevado a cabo a temperatura ambiente y conforme al método de **Haines y Chelac**, 1991. El control de los reactivos utilizados fue llevado a cabo conforme a lo señalado en el **Cuadro 14**, en cortes de duodeno e intestino medio de aves de 21 días de edad AC, ACA y 21SCI. Los cortes histológicos fueron desparafinados con xileno y alcohol antes de ser bloqueada la peroxidasa endógena con 0.03% H₂O₂ durante 15 min.; fueron lavados durante 10 min con PBS; incubados con proteinasa K (DAKO) durante 15 min que fue removida por agitación. Fue aplicado el anticuerpo primario anti-SBA producido en conejo a la dilución 1:800 en PBS durante 30 min y lavado con PBS. A continuación fue aplicado el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (DAKO) durante 30 min. El color fue revelado durante 8 min con solución de 3,3' diaminobencidina H₂O₂ (DAKO) y contrastado con hematoxilina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 42 días de edad, utilizando anticuerpos anti-SBA fue identificada SBA en el citoplasma de los enterocitos uniformemente a lo largo de las vellosidades, incluso en presencia de hiperplasia y en algunas células de la porción superior de las criptas de Lieberkühn de todas las aves del tratamiento testigo negativo 0% SCI así como en todas las de las dietas experimentales (**fig. 8-19**). En cambio, en las aves de 21 días de edad AC y 21SCI la distribución de la SBA, fue solo en el citoplasma del epitelio situado en el tercio distal de las vellosidades y en ningún caso en las células de las criptas de Lieberkühn. La distribución de la lectina en las estructuras de las vellosidades coincide con la observada por **King y col.** (1981). No fue percibida la presencia de SBA en ninguno de los cortes de las aves ACA que consumieron dieta a base de pasta de soya cocida en la autoclave. La reacción anti-SBA en el tratamiento control 0% SCI, denota que la PSD comercial contiene concentraciones residuales de SBA conforme fue señalado por **Maenz y col.** (1999). Por lo tanto, se infiere que el pollo de engorda tiene el receptor GalNac/Gal en las microvellosidades de los enterocitos, con el que interactuó específicamente la SBA y que posteriormente, esta lectina fue incorporada al citoplasma por pinocitosis. El que la distribución de la SBA haya sido diferente según la edad de las aves concuerda con **Grant** (1999), que señala que el efecto de las lectinas en el intestino y el páncreas varió en función de la especie, la dieta y la edad de los animales. Este resultado pudiera estar asociado al tiempo de maduración del epitelio intestinal del pollo. A pesar de que los enterocitos embrionarios son histológicamente semejantes a los de las aves adultas, el intestino de los pollos solo hasta la segunda o tercera semana de edad, es capaz de llevar a cabo la absorción activa en la superficie de su mucosa y digerir los alimentos que consumen las aves adultas ya que hasta entonces puede sintetizar las enzimas necesarias (**Moran**, 1996; **Sklan y Hurwitz**, 1980; **Zehava y col.**, 1999). De igual forma, el que algunas células de la porción superior de las criptas de todas las aves de 42 días hayan interactuado con la SBA pudiera deberse también al grado de maduración de las células ya que las células tallo inmaduras de las criptas se diferencian en enterocitos, células caliciformes o células endocrinas y maduran en la porción superior de las criptas de Lieberkühn (**Bjerknes y Cheng**, 1999). Los resultados antes señalados, sugieren que probablemente en el pollo de engorda, solo las células maduras del epitelio de las microvellosidades intestinales presentan receptores GalNac/Gal para la SBA y no así las células indiferenciadas de las criptas de

Lieberkühn. La interacción de la SBA con las microvellosidades, fue evidente solo en el 50% de las aves empleadas para el estudio de la interacción de la SBA con el epitelio intestinal por medio de inmunohistoquímica (**fig. 20**). Esto pudiera ser atribuido probablemente a variación de la respuesta inmune anti-SBA por parte de las aves. Las lectinas, han demostrado ser potentes inmunógenos pero la respuesta inmune fue mayor en ratas convencionales que en ratas libres de patógenos y fue diferente dependiendo del tipo de lectina. La lectina PHA fue encontrada en el torrente sanguíneo de ratas al cabo de una hora de haber sido ingerida e indujo títulos de anticuerpos IgG pero no de IgA. Mientras que, con SBA las ratas desarrollaron IgA además de IgG (**Pusztai, 1991; Mendez y col., 1998; Bardocz e Ewen, 1995; Grant, 1999**).

En el parénquima exócrino de ninguno de los cortes de páncreas, fue apreciada reacción positiva anti-SBA. En cambio, invariablemente en todas las aves estudiadas, la reacción anti-SBA fue muy intensa en algunos islotes de Langerhans, mientras que en otros fue leve (**fig. 21**). Pudiera haber interactuado la SBA con receptor GalNac/Gal de la membrana de alguna de las diferentes células que constituyen los islotes de Langerhans en las aves, en el caso de que la SBA al igual que otras lectinas, haya sido liberada en el torrente sanguíneo (**Pusztai, 1991 y Grant, 1999**). Con base en la descripción de los islotes A y B de las aves realizada por **Gümez y col. (2004)**, las características morfológicas de los islotes que en el presente estudio, se tiñeron más intensamente pudieran corresponder a la de islotes B en los que predominan las células β productoras de insulina.

En el páncreas de ave a diferencia del de mamífero, las células α secretoras de glucagón y las β secretoras de insulina fueron localizadas en islotes individuales A y B respectivamente. En cambio, las células δ secretoras de somatostatina y las PP secretoras de polipéptido pancreático aviar (PPA), fueron encontradas en ambos tipos de islotes (**Gümez y col. 2004**). **Watanabe y col. (1975)** además de abundantes células α encontraron algunas células β rodeando los capilares de los islotes, mientras que en los islotes B abundantes células β y escasa cantidad de células α en la periferia de los islotes.

CONCLUSIONES

1. El pollo de engorda presenta receptores GalNac/Gal para la SBA en la membrana de los enterocitos y en algunas de las células de los islotes de Langerhans.
2. La SBA es interiorizada al citoplasma de los enterocitos.
3. La interacción de la SBA con las microvellosidades no es permanente, ya que no todos los pollos mostraron reacción inmunohistoquímica anti-SBA en estas estructuras a pesar de que si fue observada en el citoplasma de estas mismas células.
4. Las células maduras de las vellosidades intestinales presentan receptores GalNac/Gal para la SBA y no así las células indiferenciadas de las criptas de Lieberkühn en las que no fue observada reacción anti-SBA ni en la membrana ni en el citoplasma.

LITERATURA CITADA

- Bardocz, S.; Ewen, S.W.B.; Grant, G.; Pusztai, A. Reversible effect of phytohaemagglutinin on the growth and metabolism of rat gastrointestinal tract. En: Lectins: Biomedical perspectives. Pusztai, A; Bardocz, S. eds. Taylor and Francis, S. London **1995**; 103-116 y en *Gut*, **1995**; 37:353-360.
- Bjerknes, M.; Cheng, H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* **1999**; 116:7-14.
- Calderón de la Barca A.M.; Vázquez Moreno, L.; Valencia, M.E. The lectin of *Amaranthus cruentus* resists in vivo proteolysis and affects the gastrointestinal mucosa of rats. En Bog-Hansen, T.C.; Freed, D.L.J. (Eds), Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry, Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O. USA, **1988**; 6:125-132.
- Damjanov, I. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. Invest.* **1987**; 57: 5-20.
- Entzian, P.; Barth, J.; Schumacher, U.; Petermann, W.; Ahnhaus, E. Effect of lectins on the number of glucocorticoid receptor sites. En Bog-Hansen, T.C.; Freed, D.L.J. (Eds.). Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry, "Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. **1988**; 6:11-115.
- Freeman, H.J.; Lotan, R.; Kim, Y.S. Application of lectins for detection of goblet cell glycoconjugate differences in proximal and distal colon of the rat. *Lab. Invest.* **1980**; 42: 405-412.

- Goldstein, I.E.; Poretz, R.D. The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine. Liener, I.E.; Sharon, N.; Goldstein, I.J. (Eds). Orlando USA: Academic Press **1986**.
- Grant, G. Plant lectins. In Secondary Plant Products- Antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Caygill, J.C.; Mueller-Harvey, I. 1^o published, Nittingham, University Press. U.K. **1999**: 87-110.
- Gümez, N.; Kocamis, H.; Aslan, S.; Nazli, M. Immunohistochemical distribution of cells containing Insulin, Glucagon and Somatostatin in the Goose (*Anser anser*) pancreas. *Turk. J. Vet Anim. Sci.* **2004**; 28:403-407.
- Haines, D.M.; Chelac, B.J.: Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on parafine-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic payhology. *J.Vet.Diagn Invest* **1991**; 3:101-112.
- Heras, A. Enhanced labelled-polymer suestem for immunochemistry.XVth Eur. Cong. Pathol. Copenhagen, Denmark **1995**.
- King, T.P.; Pusztai, A.; Clarke, E.M.W. Electron microscope immunochemistry of kidney bean poisoning in rats. *Micron* **1981**; 12; 191.
- Maenz, D.; Irish, G.; Classen, H. Carbohydrates-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. *Anim. Feed Sci. and Techn.* **1999**, 76, 335-343.
- Mendez, A.; Vargas, R.E.; Michelangeli, C. Effets of Concanavalin A, fed as a contituyent of Jack bean (*Canavalina ensiformis L*) seeds, on the humoral immune response and performance of broiler chickens. *Poult. Sci.* **1998**; 77:282-289.
- Moran, E.T. Jr. Intestinal physiology influencing enteric diseases in fowl. In, Enteric Disease Control. Proceeding of 39th Annual Meeting of American Association of Avian Pathologists. Louisville, Y.K. **1996**; 11-16.
- Paniagua, R.; Nistal, M.; Sesma, P.; Álavarez- Uría, M.; Fraile, B.; Amadón, R.; Sáez, F.J. Biología celular. 2^a ed., Mc Graw- Hill- Interamericana de España, S.A.U. **2003**; 39-104.
- Pusztai, A. Plant lectins, Cambridge, EDS.; Cambridge University Press: Cambridge, **1991**; 105-164.
- Sklan, D.; Hurwitz, S. Protein digestion and absorption in young chicks and turkeys. *J. Nutr.* **1980**; 110: 139-144.

- Sotelo, A.; González L.A.; González, G.M.T.; Velasco, E., Feria, V.A. Ultrastructural changes of epithelial intestinal cells induced by the ingestion of raw *Phaseolus acutifolius*. *Nutrition Reports International* **1983**; 27: 329-337.
- Suprasert, A.; Fujioka, T.; Yamada, K. The histochemistry of glucoconjugates in the colonic epithelium of the chicken. *Histochemistry* **1987**; 86: 491-497.
- Taylor, C.R. Immunocytochemical techniques: practical and theoretical aspects. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1978**; 102:113-121.
- Watanabe, T.; Ki Paik, Y.; Yasuda, M. Fine structure of the pancreatic islets in domestic fowl with special reference to the cell type and secretion. *Arch. Histok. Jpn.* **1975**; 38: 259-274.
- Zehava, U.; Noy, Y.; Sklan, D. Posthatch development of small intestinal function in the poult. *Plout. Sci.* **1999**; 78: 215-222.

Cuadro 14. *Procedimientos para el control de reactivos.*

Prueba	S. Pollo ¹ 10%	Bloq. Prot. DAKO ²	Incub. SBA ³	Ac.1° suero hiperinmune ⁴	S. conejo No inmune. ⁵	Ac. 2° DAKO ⁶
1	-	+	-	+	-	+
2	+	-	-	+	-	+
3	-	+	-	-	+	+
4	-	+	+	-	+	+
5	-	+	+	+	-	+
6	-	+	-	+	-	-

¹ Suero de pollo clínicamente sano. ² Bloqueador de proteína incluido en el sistema EnVision +, peroxidasa (DAB), rabbit de DAKO. ³ Incubación con SBA purificada DAKO 1:20 en PBS. ⁴ Suero hiperinmune de conejo 1:800 en PBS, obtenido conforme fue descrito en el capítulo V de material y métodos del proyecto. ⁵ Suero de conejo no inmunizado 1:800 en PBS. ⁶ Anticuerpo secundario incluido en el sistema EnVision +, peroxidasa (DAB), rabbit de DAKO. El signo + denota presencia y el - ausencia del producto indicado.

VIII.- EFECTO DE LA SOYA CRUDA INTEGRAL (SCI) Y DE LA SBA QUE CONTIENE, EN LOS PROCESOS DE DIGESTIÓN / ABSORCIÓN Y DE PIGMENTACIÓN EN EL POLLO DE ENGORDA.

INTRODUCCIÓN

Los efectos de los factores antinutricionales de la soya cruda en aves, han sido estudiados principalmente, a través del efecto de las dos antitripsinas en páncreas pero no en función del efecto de la SBA (Coates y Hewit, 1970, Nitsan y Nir, 1977, Applegarth y col., 1964, Bieloriai y col., 1977; Noy y Sklain, 1995). El objetivo del presente estudio fue determinar si las lesiones observadas en presencia de SBA interactuando con la membrana y en el citoplasma de los enterocitos como fue señalado en capítulos anteriores junto con los demás factores antinutricionales contenidos en la SCI, juegan un papel en los procesos de digestión y absorción en el pollo de engorda que pudiera sugerir su intervención en la patogénesis del “Síndrome de tránsito rápido” (STR) del pollo de engorda (Kouwenhoven y col., 1993; Songserm y col., 2000).

Aspecto de las excretas

Fue observada la apariencia de las heces de las aves alimentadas con dieta a base de SCI, para determinar si en forma semejante a lo observado en el STR, estas tenían aspecto desmoronado con gran contenido de líquido y contenían moco, partículas de alimento indigesto y abundante cantidad de uratos.

La apariencia de las excretas varía en función de la edad, de la hora, del día y de los componentes de la dieta sin revelar alguna patología en particular (Petersen y col., 1999). La apariencia de las excretas descritas en el STR, pudieran corresponder al efecto de una gran variedad de agentes etiológicos, de disfunciones y de lesiones que pueden estar ubicadas en tubo digestivo, en hígado y en el caso de las aves en riñón ya que sus evacuaciones están constituidas por contenido intestinal mezclado con orina (Morishita, 2000).

Un pollo evacua alrededor de 20 veces al día, a intervalos diferentes de las cuales 2 corresponden a contenido cecal, y el resto a excretas intestinales (Tyler, 1958; Hart, 1963; Duke, 1986a). Las excretas cecales son cremosas de color café o marrón (Pattison, 1987). En cambio, las excretas intestinales normales están constituidas de un componente líquido que corresponde a orina, un sólido compactado en forma de cilindros, de color verde negruzco o

marrón dependiendo de los elementos de la dieta y de la cantidad de pigmento biliar que contenga (urobilinógeno eliminado en la orina y el estercobilinógeno excretado por el colédoco), y un tercer elemento que recubre la porción sólida, de aspecto yesoso y color blanco constituido por ácido úrico que se precipita en la orina dando lugar a sales monosódicas de uratos (**Morishita, 2000**). Por lo tanto, la consistencia de las heces de aves sanas varía considerablemente según de la cantidad de orina que contiene (**Pattison, 1987**). La cantidad de líquido en las heces depende entre otros factores, de la cantidad de agua ingerida y esta su vez, de la cantidad y tipo de alimento consumido, de la edad y del peso corporal (**Sturkie, 1986 y Leeson y Summers, 2001**).

La excesiva evacuación de líquido puede deberse también, a poliuria provocada por polidipsia debida a exceso de calor ambiental; al consumo excesivo de sodio, cloro o potasio; a la ingestión de micotoxinas (ocratoxina y citrinina); a alteraciones cardíacas que cursen con hipertensión; a diuresis de origen renal provocada por reabsorción deficiente de líquidos, a alteración del sistema hormonal involucrado en esta función renal (epinefrina y norepinefrina en estados de estrés) o bien por incremento de la permeabilidad en el glomérulo renal (**Palmore y col., 1981; Sturkie, 1986; Widman, 1987; Pattison, 1987; Leeson y Summers, 2001**).

La enteritis también provoca excreción excesiva de líquido y moco. La enteritis se caracteriza por diarrea debido a bacterias enterotoxigénicas (*E.coli*, *Salmonella*) o por virosis (Reovirus, Coronavirus, Paramixovirus y Ortomixovirus) que destruyen las vellosidades intestinales (**Calnek y col., 1997**). Resulta difícil el documentar en una caseta avícola, el aumento en cuanto la frecuencia y la cantidad de las excretas que son dos de los signos de diarrea. Sin embargo, las heces demasiado líquidas, humedecen la cama que en algunas ocasiones llega a ser francamente lodosa y compacta. Cuando se reseca la cama después de un período de humedecimiento, se aprecian cama aglomerada en pedruscos grandes y duros (**Morishita, 2000**).

El exceso de humedad de la cama propicia la presentación de un brote de coccidiosis, a pesar de que en la dieta se incorpore algún coccidiostato. Las *Eimerias*, agentes etiológicos de la coccidiosis son patógenos persistentes en las explotaciones avícolas que provocan cuantiosas pérdidas debido a enteritis, mala absorción, pigmentación deficiente, inmunodepresión y elevada tasa de mortalidad (**Allen, 1992; Calnek y col., 1997; Morishita,**

2000). La gran cantidad de líquido en la diarrea, proviene de la hipersecreción de la mucosa intestinal, por incremento de la motilidad del tubo digestivo y por aumento de la permeabilidad vascular propia del proceso de inflamación (**Morishita**, 2000).

El origen de los componentes de la porción sólida de las excretas es por una parte, alimenticio (residuos indigestos) y por otra, de origen metabólico, células descamadas, productos de fermentación bacteriana, restos de secreciones del aparato digestivo y proteína endógena (**Pattison**, 1987). La cantidad de material sólido excretado depende de la cantidad y calidad del alimento ingerido y de la eficiencia del metabolismo. Una excreta fresca de ave Leghorn, está constituida por 30% de sólidos y 70% de líquido de manera que un ave de 2.268 kg evacua 91g de heces frescas por día (**Hart**, 1963).

La presencia de moco en las excretas puede tener un significado particular ya que además de sugerir el desarrollo de enteritis como fue señalado anteriormente, también puede estar relacionado con la edad de las aves, con el tipo de granos utilizados o con la inclusión de xilanos en dieta. La xilanasas contrarrestó el incremento de la viscosidad del contenido intestinal provocada por polisacáridos no amiláceos (PNA) presentes en el trigo, pero incrementó la cantidad de mucinas neutras, carboxiladas y sulfatadas y alteró así mismo, los glicoconjugados de las células caliciformes del tracto intestinal de los pollos. El mecanismo por medio del cual la xilanasas provoca mayor síntesis de moco, no fue determinado (**Sharma y col.**, 1997; **Petersen y col.**, 1999; **Montagne y col.**, 2004)

El moco secretado por las células caliciformes del epitelio intestinal junto con el agua atrapada en el glicocalix que recubre las microvellosidades de los enterocitos, constituyen una barrera que las micelas deben franquear para ser absorbidas (**Nimmerfall y col.**, 1980). Una vez integradas las micelas al moco, estas son desintegradas en sus componentes moleculares a medida que se van acercando a la membrana de las microvellosidades de los enterocitos. De esta manera, en el agua estática que se encuentra adosada a las microvellosidades, se forman focos de concentración de moléculas independientes por lo que se ve favorecida su difusión y paso a través de la membrana celular (**Moran**, 1985).

Parámetros productivos

En el presente estudio, los procesos de digestión/ absorción de nutrientes fueron evaluados por medio de la estimación de la ganancia de peso y del índice de conversión entre otros. Estos parámetros productivos reflejan con precisión el aprovechamiento de los nutrientes y el estado de salud de una parvada (**North y col.**, 1993 y **Quintana**, 1999).

Relación consumo agua/ alimento

Fue determinada la relación consumo agua/alimento, con objeto de investigar si el consumo de SCI provocó mayor consumo de agua (polidipsia). Ha sido demostrado que el consumo de agua en las aves de corral está en relación al peso y la edad de las aves, a la temperatura ambiental y al tipo y cantidad de alimento consumido. Las gallinas ponedoras no solo ingirieron más alimento que los machos sino que también consumieron más agua (13.6% de su peso corporal). De igual manera, los pollos de engorda de entre 3 y 4 semanas consumieron alrededor de 18 a 20% de su peso corporal guardando una relación de consumo de agua: alimento de 2:1 (**Sturkie**, 1986). Un pollo de 2.4 Kg consume entre 8-9 litros de agua en total hasta los 49 días de edad (**Pattison**, 1987). El incremento de la ingestión de NaCl, provocó un estímulo en el hipotálamo y en la región yuxtaventricular con secreción de angiotensina II, sensación de sed y por ende polidipsia (**Sturkie**, 1986).

Análisis químico de las excretas y concentración sérica de ácido úrico

Fue determinado por medio del análisis químico de las excretas, el contenido de proteína cruda (PC), proteína verdadera (PV) y de nitrógeno no protéico (NNP); así como, la concentración de ácido úrico en el suero para conocer el efecto de la SBA en cuanto a la función intestinal de digestión/absorción de proteína y el metabolismo de esta a nivel renal (**Tejada**, 1992; **Miles y col.**, 1976). El nitrógeno endógeno, es excretado por heces y por orina (**Oliveira y Sgarbieri**, 1986). El 85% del nitrógeno excretado está en forma de ácido úrico, amonio, ácidos de amonio y creatina (**Pattison**, 1987). El ácido úrico en las excretas proviene del metabolismo de las proteínas, por lo tanto hace parte del nitrógeno no proteínico. El ácido úrico es poco soluble en agua, pero sus sales (cristales monosódicos de uratos) son considerablemente más solubles (**Sykes**, 1981). En las excretas de ave, la proporción de ácido úrico en solución, en estado coloidal y precipitado en forma de cristales es de 1:2:12 respectivamente (**Skadhauge**, 1983). La excreción de ácido úrico, depende de la secreción

activa del epitelio de los túbulos contorneados proximales de la nefrona y es independiente del estado de hidratación y del flujo urinario (Dantzler, 1978; Skadhauge, 1983).

A diferencia de los mamíferos, las aves son uricotélicas, ya que carecen de uricasa hepática que transforma el ácido úrico en alantoina. Por lo tanto en aves, el principal producto del catabolismo de las proteínas, del nitrógeno no proteínico y de las purinas es el ácido úrico y la determinación de los valores séricos de ácido úrico (SAU), es más útil que el de urea, para evaluar la disfunción renal (Lewandowski y col., 1986). En el suero de las aves, el nitrógeno no proteínico está compuesto por urea, creatina, ácido úrico, aminoácidos, amonio y nitrógeno no determinado (Charles, 1998). Valores de ácido úrico altos en suero denotan insuficiencia renal por lesión o disfunción del epitelio tubular, ya que este es excretado con la orina por secreción activa del epitelio de los túbulos contorneados proximales de las nefronas tanto de tipo mamífero como reptil (Dantzler, 1978). Con base en los resultados de numerosos autores, el valor normal de SAU en la mayoría de las aves, varía considerablemente entre 1 a 15 mg/dl dependiendo de los componentes de la dieta, especie, edad, época del año y estado fisiológico (Siller, 1981; Lewandowski y col., 1986; Charles, 1998; Ross y col., 1978; Coles, 1989). Valores que exceden los 15 mg/dl, son considerados como patológicos y corresponden a uremia o hiperuricemia. Esta toxicosis, resulta del incremento plasmáticos de productos nitrogenados resultantes del catabolismo de las proteínas (urea, creatinina) y compuestos nitrogenados (guanidina, ácido fenólico y alcoholes de alto peso molecular tales como mioinositol), que normalmente son eliminados a través de la orina.

Concentración sérica de xantofilas y pigmentación cutánea

Fue cuantificada la concentración de xantofilas en el suero, la cantidad de extracto etéreo en las heces, y la intensidad de la pigmentación cutánea para evaluar el efecto de las alteraciones intestinales provocadas por la SBA en relación a la absorción de xantofilas y en función de la digestión/ absorción y excreción de lípidos. No ha sido señalado aún el papel de las SBA, en relación a la absorción de las xantofilas. La SBA pudiera tener algún efecto nocivo con respecto a la absorción del pigmento, no solo por dañar el epitelio intestinal como fue señalado en capítulo anterior sino también, por incrementar el catabolismo de los lípidos del tejido adiposo subcutáneo, lo cual puede reflejarse en disminución de la intensidad en la pigmentación cutánea (Oliveira y Sgarbieri, 1986). Por otro lado, la excesiva producción de moco en intestino a causa de la SBA, pudiera ser otro factor más que obstaculizara la

absorción de los pigmentos ya que, el moco atrapado en la red del glicocalix actúa como una barrera tridimensional que excluye y restringe la difusión de partículas y compuestos de gran peso molecular (**Moran, 1996 y Sharma y col., 1997**).

La pigmentación cutánea es muy importante para la comercialización del pollo de engorda, en varios mercados incluso el mexicano. Los consumidores prefieren un pollo con la piel amarillo-naranja que asemeja los tonos del maíz amarillo, ya que asocian esta característica a frescura, salud del animal y alimentación natural como en el rancho (**Schiedt, 1998 y Cortes, 1998**). La adición de pigmento (carotenoides) al alimento incrementa mucho el costo de producción en la industria avícola (**Sunde, 1992 y Songserm y col., 2000**). En 1992, la venta de pigmentos en los Estados Unidos ascendió a \$150 millones /año y en Europa a \$100 millones /año (**Sunde, 1992**).

Las plantas son la única fuente de carotenoides, ya que las aves no pueden sintetizarlos. Por lo tanto, la pigmentación de la piel, el tejido adiposo y la yema del huevo de las aves depende de los carotenoides que ingieren en la dieta. En las aves, los procesos metabólicos ligados al sexo y la edad constituyen factores esenciales para que se lleve a cabo el depósito de pigmentos ya sea en el tejido adiposo, la piel, el pico y la queratina de las patas o bien en la yema del huevo (**Tyckowski y Hamilton, 1986**). Los pigmentos del tipo de los carotenoides son compuestos liposolubles, terpénicos de alto peso molecular (40 carbonos). Con base en su composición química, los carotenoides se dividen en carotenoides que no contienen oxígeno en su estructura molecular y en oxicarotenoides, también conocidos como xantofilas. Estos últimos son los compuestos oxigenados de color amarillo, rojo o púrpura, de mayor interés para la industria avícola (**Schiedt, 1998**). Entre las xantofilas se encuentran la luteína, la zeaxantina, la cantaxantina, la astaxantina, el apocaroteno, la capsantina y la citranaxantina que además de pigmentar algunas son fuente de β caroteno en aves que sufran deficiencia de vitamina A (**Schiedt, 1998**). Los pétalos de la flor de Cempasúchil (Marigold o *Tagetes erecta*) son los más empleados como fuente de xantofilas, ya que contienen luteína y zeaxantina esterificados con ácidos grasos en una proporción de 90:10 (**Marusich y Bauernfeind, 1981**). La luteína que es el mejor di-hidroxicarotenoide para pigmentar el pollo de engorda, puede ser acetilado para formar luteína monoéster y diéster. A su vez los diéster pueden ser deacilados por la acción de las lipasas pancreáticas para formar otra vez luteína (**Tyckowski y Hamilton, 1986**). La zeaxantina es también un di-hidroxicarotenoide que se

encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y está relacionada íntimamente con la estructura de la luteína. La diferencia entre ambas moléculas consiste en la posición de la doble ligadura en el anillo de b-ionona. Debido a esto, la zeaxantina presenta un color más intenso en la gama de los anaranjados y no de los amarillos como la luteína y esta última se deposita 15% más que la zeaxantina en la piel de los tarsos (**Marusich y Bauernfiend, 1981**).

En el proceso de absorción de los carotenoides interviene el tipo y la cantidad de pigmentos y de lípidos administrados en la dieta debido a que son liposolubles (**Schiedt, 1998 y Hamilton, 1987**). Por lo tanto la absorción de los pigmentos está íntimamente relacionada con el metabolismo de los lípidos, y la absorción de estos al nivel del duodeno y del yeyuno. Para que sean absorbidos los pigmentos es indispensable la integridad del epitelio de la mucosa intestinal ya que las xantofilas son re-esterificadas e integradas a proteínas de alta densidad (apolipoproteína A-1), que son sintetizadas en el citoplasma de los enterocitos antes de ser liberadas en la sangre y depositadas en las células blanco del tejido adiposo y epitelio cutáneo (**Schiedt, 1998 y Leeson y Summers, 2001**). Consecuentemente, además de la integridad de la mucosa intestinal, es determinante la adecuada cantidad y calidad de sales biliares, así como de enzimas pancreáticas e intestinales para que se lleve a cabo la emulsificación, saponificación e hidrólisis de las grasas que las convierte en micelas para poder ser incorporadas al citoplasma de los enterocitos (**Scott y col., 1982 y Schiedt, 1998**). Para que las micelas sean absorbidas e incorporadas al citoplasma de los enterocitos, estas deben atravesar la capa de agua estática producida por las microvellosidades y el glicocalix del enterocito y el moco sintetizado por las células caliciformes adyacentes que actúa como un gel que impide el movimiento de las macromoléculas (**Nimmerfall y Rosenthaler, 1980**). Sin embargo, ya que fueron integradas al moco, las micelas son disgregadas en sus componentes moleculares por medio de la actividad de las lipasas que los enterocitos secretan en el glicocalix en el que se encuentran sumergidas sus microvellosidades (**Duke, 1986b**). A medida que se van acercando estas moléculas a la membrana de las microvellosidades se van acumulando en focos de alta concentración, lo cual favorece su difusión y paso al citoplasma de los enterocitos (**Moran, 1985**). Se cree que la tasa de movimiento depende de la carga, el grado de hidratación y de uniones hidrógeno entre las micelas (**Nimmerfall y Rosenthaler, 1980**).

Una vez integradas las micelas, al citoplasma de los enterocitos los lípidos son ligados a apoproteína I para ser transportados a través del sistema porta como lipoproteínas de alta densidad denominadas “portomicrones” y no “quilomicrones”, termino empleado en los mamíferos (Moran, 1985; Griminger y Scane, 1986). A continuación, son temporalmente almacenados en el hígado y finalmente depositados como luteína monoester, diester y en su forma libre en el tejido adiposo, la piel, el pico y la queratina de las patas (Tyczkowski, 1986). En aves, el porcentaje de absorción de los ácidos linolénico y linoleico (entre 85-92%) es mayor que el del ácido esteárico (entre 58-66%) (Sklan y col., 1975). El porcentaje de absorción de triglicéridos del aceite de soya es de 96%, mientras que el del aceite de maíz es de 94% así mismo el porcentaje de absorción de triglicéridos hidrolizados es de 96% para el aceite de soya y de 95% para el de maíz en pollos de más de 8 semanas (Scott y col., 1982).

El incremento de lípidos en las excretas puede denotar deficiencia de lipasas hepáticas, pancreáticas e intestinales que convierten los lípidos en micelas al hidrolizar los triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol que a su vez son absorbidos por los enterocitos. En los enterocitos son conjugados a proteínas para ser transportados a través del sistema porta como portomicrones para ser absorbidos (Moran, 1985 y Griminger y Scane, 1986).

Con base en estas consideraciones, resulta relevante el determinar el valor de carotenoides en el suero y la pigmentación cutánea de pollos de engorda alimentados con SCI.

HIPOTESIS

La inclusión de SCI en la dieta de pollos de engorda provoca indigestión, absorción de nutrientes deficiente debido a las lesiones provocadas por la SBA que contiene la SCI, en los tejidos del tubo digestivo que a su vez, son responsables de retraso en el crecimiento con baja ganancia de peso, alta conversión y pigmentación cutánea deficiente.

La inclusión de SCI en la dieta de pollos de engorda provoca emisión de excretas acuosas con partículas de alimento indigestas y moco color naranja.

OBJETIVOS

Determinar el efecto patógeno de la SCI y su SBA en los procesos de digestión y de absorción en el pollo de engorda por medio de la determinación de, los parámetros

productivos, el análisis químico de las excretas, la concentración sérica de xantofilas y la intensidad de la pigmentación cutánea.

Calcular la relación consumo agua/alimento y determinar la concentración sérica de ácido úrico para evaluar si el consumo de SCI altera el aspecto morfológico de las excretas del pollo de engorda por provocar diuresis por insuficiencia renal o por poliuria por incrementar el consumo de agua.

MATERIAL Y METODOS

Aspecto de las excretas

Durante 42 días fueron fotografiadas cada 7 días, 3 excretas al azar, de cada tratamiento con objeto de observar cambios en la apariencia de las deyecciones en función de los tratamientos.

Parámetros productivos

Para estimar el índice de conversión fue registrado el peso del alimento suministrado y el restante en cada grupo durante los 42 días y fue calculado el consumo promedio de ave por día, por tratamiento así como, el consumo total por ave por tratamiento durante los 42 días y fue registrado el peso individual de cada ave al cabo de 42 días y calculado el peso promedio por ave por tratamiento. La ganancia de peso fue calculada restando el peso al 1º día de edad al promedio de peso por ave por tratamiento a los 42 días. El índice de conversión fue calculado dividiendo el promedio de consumo total de un ave por tratamiento por el promedio de la ganancia de peso individual por tratamiento al cabo de 42 días conforme a **North y Bell** (1993) y **Quintana** (1999).

Relación consumo agua/ alimento

Fue calculado el consumo diario de agua y de alimento por ave entre los días 35 y 42 de edad, para obtener la relación correspondiente.

Análisis químico de las excretas y concentración sérica de ácido úrico

En 3 muestras de excretas tomadas al azar el día 38 de edad y mezcladas para formar una sola muestra por tratamiento, fue cuantificado el contenido de la proteína cruda (PC) por el método de Kjeldahl, el del nitrógeno no proteico (NNP) por medio del método de ácido tricloracético y el de EE por medio de extracción en éter etílico conforme al protocolo de la **A.O.A.C.** (1990) y **Tejada** (1992). El contenido de proteína verdadera (PV) en excretas es

decir la no digerida ni absorbida, fue estimado sustrayendo el valor de la PC al de NNP debido a que en las aves, el nitrógeno total o PC excretado en las heces está constituido por solo 15% de PV y 85% de NNP correspondiente a productos de la orina y otros desechos del tubo digestivo (**Bielorai y col.**, 1985).

A los 42 días de edad de las aves, que terminó el experimento, fueron determinados los valores séricos de ácido úrico de 12 aves por tratamiento conforme al método de **Young** (1990). Para dicho estudio fue utilizado un espectrofotómetro de líquidos COBAS-Mira Roche, a 500 nm de absorbancia y a 37° C, utilizando 5 µl de muestra, 250 µl de reactivo y 351 µmol/l de solución estandar del ensayo enzimático colorimétrico para ácido úrico (Diagnostic Chemicals Limited. Ref. 220-93; 220-94; 220-15; 220-S4).

Concentración sérica de xantofilas y pigmentación cutánea

A partir de los 22 días de edad y hasta el final del experimento se agregó a todas las dietas a razón de 70 ppm, un pigmento (Industrial Orgánica) consistente en un extractado de flor de cempasúchil con xantofilas isomerizadas e hidrolizadas. Los valores de xantofilas séricas fueron evaluados en relación al consumo total de xantofilas durante los últimos 21 días.

A los 42 días de edad, la concentración de xantofilas fue determinada en el suero de 9 pollos por tratamiento. Para dicha determinación fue utilizada una solución 1:10 de suero/acetona y un espectrofotómetro Milton Roy spectronic 20D, a 480 nm de absorbancia de líquido conforme al método de **Allen y col.** (1996).

La pigmentación de la piel fue evaluada en 10 aves vivas por réplica y utilizando un colorímetro de reflectancia Minolta CR300. El colorímetro de reflectancia convierte los colores percibidos por el ojo humano, a códigos numéricos del sistema CIE Lab en el que la sigla "L" corresponde a la luminosidad, la "a" al enrojecimiento y la "b" al amarillamiento. La medición fue realizada en la piel de la región costal desprovista de plumas que se encuentra adyacente a la última costilla.

Fue calculado el consumo total de pigmento durante los 21 días que les fue suministrado y la media de la superficie cutánea de los pollos a los 42 días de edad con base en el fundamento de que, en los cuerpos de la misma forma y de igual densidad, el área de la superficie es proporcional al peso elevado a la potencia dos tercios $P^{0.67}$ (**McDonald**, 1999).

La cuantificación de extracto etéreo en las heces fue realizada por extracción en éter etílico conforme al protocolo de la **A.O.A.C.** (1990) y **Tejada** (1992), en forma individual a partir de dos muestras por tratamiento, obtenidas a los 38 días de edad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aspecto de las excretas

A partir de los 28 días de edad, las excretas de los tratamientos 0% y 20% SCI fueron aparentemente las más acuosas, con aspecto desmoronado y partículas de alimento indigesto. A medida que fue mayor el porcentaje de SCI en la dieta a simple vista, la humedad en las excretas disminuyó sensiblemente mientras que la cantidad de moco naranja aumentó. Era de esperarse que la producción y secreción de moco se incrementara con el consumo de SCI, ya que la SBA que contiene al igual que otras lectinas, provocan hiperplasia de las células caliciformes del tubo gastrointestinal (**Cuadro 8**) (**Calderón de la Barca y col.**, 1987; **Pusztai y col.**, 1988; **Sotelo y col.**, 1983).

El que la humedad en las excretas haya disminuido conforme se incrementó el porcentaje de SCI en la dieta, sugiere que los constituyentes de la SCI y en particular la SBA, no inducen incremento en la excreción de líquidos ya que, conforme a los resultados de varios autores, la excreción de líquido guardó relación con el peso de las aves y la relación consumo de agua / alimento como puede observarse en los **Cuadros 15, 16 y 17** y (**Stukie**, 1986; **Leeson y Summers**, 2001).

Parámetros productivos

Al cabo de 42 días la mortalidad general fue de 1.1%, solo 2 de 180 pollos murieron; uno del grupo 3 con la dieta 0% de SCI el día 4 y el otro del grupo 2 con la dieta 40% de SCI el día 19 por lo que no es atribuible al efecto de los tratamientos.

A medida que se incrementó la cantidad de SCI en la dieta, disminuyeron tanto el consumo de alimento ($P \leq 0.001$) conforme a la ecuación $Y = 67.07 + 0.036 S + 0.002 S^2$ siendo $R^2 = 0.7139$; así como la ganancia de peso ($P \leq 0.001$) conforme a la ecuación $Y = 1837.33 - 8.93 S$ siendo $R^2 = 0.9105$. Consecuentemente, el índice de conversión aumentó ($P \leq 0.001$) conforme a la ecuación $Y = 1.4847 + 0.01 S$ $R^2 = 0.7454$ (**Cuadros 15 y 16**).

Coates y Hewitt, (1970) señalan que cuando mayor es el consumo de alimento mayor es la ganancia de peso. La disminución lineal tanto del consumo como de la ganancia de peso

($P \leq 0.001$) a medida que fue mayor el porcentaje de inclusión de SCI en la dieta, ha sido atribuido principalmente al efecto antinutricional de los antitripsicos contenidos en la soya: el factor de Kunitz que bloquea solo a la tripsina y el factor de Bowman-Birk que inhibe no solo a la tripsina sino también a la α -quimotripsina (Balloun, 1980; Baintner, 1993; Douglas y col., 1999). Sin embargo, Gertler y col., (1967) atribuyeron la disminución de la ganancia de peso en gran parte, a la SBA ya que la adición de inhibidor de Kunitz redujo en promedio 6% el crecimiento de pollos mientras que con el suministro de SCI la reducción de peso fue de 43.5% en relación al de los pollos alimentados con PSD apropiadamente cocida. Consecuentemente, estos autores concluyeron que los antitripsicos de la soya jugaron un papel menor en el crecimiento corporal deficiente de las aves. Siendo que fisiológicamente, el intestino de los pollos secreta enterocinasa que convierte el tripsinógeno secretado por el páncreas en tripsina y a su vez, las secreciones pancreáticas estimulan la secreción de enterocinasa intestinal, Duke (1986b) y Lepovsky y Furuta (1970) también consideraron que, la patogenicidad de la SBA sobre el epitelio intestinal podría jugar un papel muy importante en estos procesos enzimáticos ya que esta inhibe la producción de tripsina, debido a que impide la secreción de enterocinasa por parte de las células enterocromafines ubicadas en las criptas de Lieberkühn.

Relación consumo agua/ alimento

La relación del consumo de agua: alimento, disminuyó en forma lineal, 4.3% ($P \leq 0.001$) a medida que fue sustituido 20% de PSD por SCI como lo explica la ecuación $Y = 2.3200 - 0.005X$ con una $R^2 = 0.2767$ (Cuadros 17 y 18). Se concluye que ni la SBA, ni los factores antitripsicos de la SCI, provocaron mayor consumo de agua, siendo que el mayor consumo de agua guardó relación con el peso corporal, el consumo de alimento y con el aspecto desmoronado y gran cantidad de agua de las excretas.

Análisis químico de las excretas y concentración sérica de ácido úrico

El efecto de la SBA junto con los demás factores antinutricionales de la SCI sobre los procesos de digestión/absorción, se vió reflejado en el análisis químico de las excretas, en el consumo de alimento, en la ganancia de peso y por consiguiente en el índice de conversión. En las excretas el contenido PC o nitrógeno total obtenido por el método de Kjeldahl está constituido por dos fracciones: la PV correspondiente a la no aprovechada ya sea por indigestión o por mala absorción y, por el NNP es decir, por la fracción constituida por ácido

úrico, amoníaco, ácidos de amonio, urea, creatinina que son productos del metabolismo de las proteínas y de la fermentación bacteriana (Pattison, 1987)

En el presente estudio, a pesar de que en las excretas no fue apreciada diferencia significativa ($P > 0.05$) en cuanto a nitrógeno total o proteína cruda (PC), como era de esperarse, el incremento progresivo ($P \leq 0.01$) del contenido de PV conforme a la ecuación $Y = 182.04 + 0.41 S$ siendo $R^2 = 0.6724$, sugiere que fue mayor la indigestión de proteínas a medida que aumentó el porcentaje de SCI, en la dieta tal como ha sido observado en ratas con otros tipos de lectina (Coates y Hewitt, 1970; Pusztai, 1991; Bielorai y Iosif, 1987) (Cuadro 17 y 18). Contrariamente a lo observado por Oliveira y Sgarbieri (1986) en ratas alimentadas con *Phaseolus vulgaris*, en aves no pudo ser comprobado que el consumo de SCI incrementa el catabolismo de proteínas musculares ya que los valores de NNP disminuyeron ($P \leq 0.05$) paulatinamente conforme a la ecuación $Y = 119.74 - 0.23 S$ siendo $R^2 = 0.5906$.

Miles y Featherston (1976) observó que en pollos alimentados con proteína de baja calidad, era menor la cantidad de nitrógeno incorporado a las proteínas del cuerpo y mayor la de ácido úrico excretado en comparación con aquellos que fueron alimentados con proteína de alta calidad por lo que se infiere que la SCI pudiera ser considerada de baja calidad o fue mal digerida la proteína. Sin embargo, Coates y Hewitt (1970) señalan que a mayor ganancia de peso, mayor es el consumo de alimento por lo que también es mayor la excreción de NNP, si toda la proteína contenida en la dieta es absorbida y metabolizada. Por lo tanto la disminución del contenido de NNP en excretas observada en el presente estudio, pudo deberse a que disminuyó el consumo de alimento a medida que aumentó la cantidad de SCI en la dieta ($P \leq 0.001$) (Cuadros 15 y 16).

Aunque por cada 20% de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI, los valores séricos de ácido úrico disminuyeron 58.2 mmol/l en forma cuadrática ($Y = 320.89 - 2.91 S + 0.023 S^2$) ($P \leq 0.05$) hasta que fue sustituido el 100% de PSD por SCI (Cuadros 15 y 16), ningún valor rebasó el considerado como normal en aves que es de 594 mmol/l (10 mg/dl), por lo que se deduce que ni la PSD ni la SCI indujeron el desarrollo de uremia y por lo tanto no contienen ningún factor nefropatógeno (Bell y col., 1959; Siller, 1981; Sturkie, 1986).

Concentración sérica de xantofilas y pigmentación cutánea

En el presente estudio, el incremento de SCI en dieta incrementó la absorción de xantofilas y disminuyó la absorción de proteínas debido probablemente a los cambios

patológicos en el epitelio intestinal, provocados por la interacción e incorporación intracitoplásmica de la SBA en los enterocitos. El hecho de que la concentración de xantofilas en suero haya aumento linealmente ($P \leq 0.01$) conforme a la ecuación $Y = 0.1008 + 0.0013 S$ siendo $R^2 = 0.2666$, a pesar de disminuir también en forma lineal ($P \leq 0.01$) el consumo de alimento y por ende el consumo total de xantofilas conforme a la ecuación $Y = 15.46 - 0.0769 S$ siendo $R^2 = 0.6254$, sugiere que el proceso de absorción del pigmento fue más eficaz a medida que aumentó el porcentaje de inclusión de SCI en la dieta (**Cuadros 15 y 19**).

Esto pudo deberse a que las células producto de la hiperplasia maduraron lo suficiente durante su migración hacia el ápice de las vellosidades y que por consiguiente se incrementó la superficie de absorción. Este incremento de la superficie del epitelio de absorción debido a la hiperplasia inducida por la SBA ha sido señalado por **Pusztai** (1991). También pudo haber influido favorablemente en el proceso de pigmentación el que al nivel del duodeno y el primer tercio del yeyuno, la SCI beneficia significativamente la absorción de lípidos y por consiguiente de xantofilas que son compuestos liposolubles y a que la SCI no afecta la digestión de los lípidos ya que no interfiere en el patrón de ruptura de los triglicéridos en duodeno ni inhibe la actividad de las lipasas en el contenido intestinal (**Leeson y col.**, 2001; **Krogdahl**, 1985; **Sklan y col.**, 1973; **Sklan y col.**, 1975). **Tyczkowski, y col.** (1986) encontraron que la luteína, el pigmento más abundante en los pétalos de Marigold, es principalmente absorbido justamente al nivel de duodeno y yeyuno. Por otra parte, siendo que el contenido porcentual de ácido linoleico en la soya (6.9) es aproximadamente 5 veces mayor al del aceite de maíz (1.4) según ha sido señalado por **Leeson y col.**, 2001, la mayor absorción de pigmento pudo deberse igualmente a que aumento la concentración de ácido linolénico en la dieta a medida que fue sustituida la PSD por porcentajes mayores de SCI como puede apreciarse en los (**Cuadro 1**). Las aves son capaces de sintetizar ácido oléico a partir de ácido esteárico pero no es así en el caso de los ácidos linoléico, linolenico y araquidónico por lo que estos son nutrientes esenciales para esta especie (**Klasing**, 1998). Los ácidos grasos insaturados entre los que se encuentra el ácido linoléico, favorecen la absorción de los pigmentos en mayor proporción que los ácidos grasos saturados (**Tyczkowski y col.**, 1987).

La mayor absorción de pigmento se vió reflejada en el incremento del depósito de pigmento en la piel ($P \leq 0.05$) que mostró más amarillamiento a medida que fue mayor el porcentaje de SCI en la dieta (**Cuadro 19**). Sin embargo, el aumento lineal del amarillamiento

de la piel fue observado solo hasta el 60% de sustitución de PSD por SCI, y este disminuyó con niveles mayores de sustitución conforme a la ecuación $Y = 27.85 + 5.6 S - 0.677 S^2$ siendo $R^2 = 0.0919$. Este efecto puede estar relacionado con la cantidad de ácidos grasos excretados.

Los valores de extracto etéreo en las heces que corresponden a la excreción de ácidos grasos, aumentaron ($P \leq 0.05$) a medida que aumentó el porcentaje de inclusión de SCI en la dieta conforme a la ecuación $Y = 116.75 + 0.53 S$ siendo $R^2 = 0.8111$ (**Cuadros 17 y 18**). Estos resultados coincidieron con los resultados de Sklan y col. (1973) y Sklan y col. (1975) que observaron que, a pesar de que la SCI aumenta la absorción de lípidos y ácidos biliares en duodeno y la primer porción del yeyuno también reduce la desaparición de los residuos de estos compuestos en íleon y colon por lo que se incrementa la excreción de ácidos grasos y ácidos biliares. Sin embargo, el incremento de ácidos grasos en las excretas también pudo deberse a un mayor catabolismo de los lípidos del tejido subcutáneo como en el caso de las ratas alimentadas con la PHA en las que fue observado excreción de triglicéridos provenientes del catabolismo del tejido adiposo subcutáneo (Pusztai, 1991). El posible mayor catabolismo del tejido adiposo subcutáneo debido a altas concentraciones de SBA en la dieta, también podría ser la explicación del porque el amarillamiento cutáneo fuera menor en los pollo alimentados con 80 y 100% SCI en la dieta con concentraciones de SBA mayores a $2747 \mu\text{g/g}$ que en los de las dietas de 0% hasta 60% SCI (**Cuadro 19**).

CONCLUSIONES

1. Ni la SBA ni los factores antinutricionales de la SCI provocaron mayor consumo de agua.
2. El aspecto desmoronado y acuoso de las excretas observado en los tratamientos con mayor porcentaje de proteína de PSD en la dieta, estuvo relacionado con el mayor peso corporal asociado a mayor consumo de alimento y de agua.
3. La ingestión de SCI y las lesiones en el tubo digestivo relacionadas con la interacción de la SBA con el epitelio intestinal, provocaron alto índice de conversión, incremento de excreción de moco, de proteína verdadera y de ácidos grasos pero, disminución de la excreción de nitrógeno no proteico.
4. La ingestión de SCI no provocó uremia lo que denota que no hubo daño renal.

5. La excesiva excreción de moco debido a hiperplasia de células caliciformes asociada a la interacción de la SBA con el epitelio intestinal en los tratamientos con mayor porcentaje de SCI, no obstaculizaron la absorción de pigmento ni la pigmentación cutánea.
6. La ingestión de SCI favoreció notablemente la absorción de xantofilas por lo que se incrementó la concentración sérica de xantofilas y la pigmentación cutánea.

LITERATURA CITADA

- A.O.A.C. Official methods of analysis. 15th ed., Arlington, Association of Official Analytical Chemists: Washington (DC), 1990.
- Allen, P.C. Effect of coccidiosis on the distribution of dietary lutein in the chick. *Poult. Sci.* 1992; 9: 1457-1463.
- Allen, P.C.; Danforth, H.D.; Morris, V.C.; Levander, O.A. Association of lowered plasma carotenoids with protection against cecal coccidiosis by diets high in N-3 fatty acids. *Poult. Sci.* 1996; 75:966-972.
- Applegarth, A.; Furuta, F.; Lepkovsky, S. Response of the chicken pancreas to raw soybeans. *Poult. Sci.* 1964; 43:733-73.
- Baintner, K. Fate of the antinutritive proteins of soybean in the ovine gut. *J. Vet. Med. A.* 1993, 40, 427-431.
- Balloun S.L. Soybean meal in poultry nutrition. Edited by Kenneth C. And M.S. Lepley. American Soybean Association. The Ovid Bell Press, Inc., Foulton, St Louis M.O. USA. 1980; 6-35.
- Bell, D.J.; McIndoe W.M.; Gross, D. Tissue components of the domestic fowl. The non-protein nitrogen of plasma and erythrocytes. *Biochemical Journal.* 1959; 71: 355-364.
- Bielorai, R.; Tamir, M.; Hurwitz, S. Amino acid absorption along the intestinal tract of chicks fed heated and raw soybean meal. *J. Nutr.* 1977; 107:1775-1778.
- Bielorai, R.; Iosif, B.; Neumark, H. Nitrogen absorption and endogenous nitrogen along the intestinal tract of chicks. *J. Nutr.* 1985, 115, 568-572.
- Bielorai, R.; Iosif, B. Amino acid absorption and endogenous amino acids in the lower ileum and excreta of chicks. *J. Nutr.* 1987; 117:1459-1462.
- Calderón de la Barca, A.M.; Vázquez Moreno, L.; Valencia, M.E. The lectin of *Amaranthus cruentus* resists in vivo proteolysis and affects the gastrointestinal mucosa of rats. En

- Bog-Hansen, T.C.; Freed, D.L.J. (Eds), Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry, "SIGMA Chemical Co., St. Louis, M.O. USA, 1988; 6:125-132.
- Calnek, B.W.; Barnes, H.J.; Beard, W.C.; McDougald, R.L.; Saif, Y.M. Eds. Diseases of poultry. 10^o edition. Iowa State University Press. Mes, Iowa, USA 1997; 511-785.
- Charles, L.M. Química sanguínea de las aves. VII Jornadas Médico avícolas. F.M.V.Z. U.N.A.M., D.F., México. 1998; 48-54.
- Coates, M.E.; Hewitt, D. A comparison of the effects of raw and heated soya-bean meal in diets for germ-free and conventional chicks. *Br. J. Nutr.* 1970, 24, 213-225.
- Coles, E.H. Diagnóstico y Patología en Veterinaria 4^o Ed. Trad por Pérez, G.J.; Garcia, S. L. Interamericana. McGraw-Hill. México 1989; 299-300.
- Cortes, C.R. Efectos de la coccidiosis sobre la pigmentación del pollo de engorda. Revisión bibliográfica. VII Jornada Médico Avícola. D.F., México. 1998; 83-93.
- Dantzler, W.H.Y. Rate excretion in non-mammalian vertebrates. In: Uric acid. Kelly, W.N.; Weiner, I.M. (Eds). Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, Berlin. 1978.
- Douglas, M.W.; Parsons, C.M.; Hymowitz, T. Nutritional evaluation of lectin-free soybeans for poultry. *Poult. Sci.* 1999, 78, 91-95.
- Duke, G.E. Alimentary canal: anatomy, regulation of feeding, and motility. In, Sturkie PD. Avian physiology, 4th ed.; Springer-Verlag: New York, 1986 a, 269-288.
- Duke, G.E. Alimentary canal: Secretion and digestion, special digestive functions, and absorption. In, Sturkie PD. Avian physiology, 4th ed.; Springer-Verlag: New York, 1986 b, 289-302.
- Gertler, A.; Birk, Y.; Bondi, A. Comparative study of the nutritional and physiological significance of pure soybean trypsin inhibitors and of ethanol extracted soybean meals. *J. Nutr.* 1967; 91: 358-370.
- Griminger, P.; Scane, C.G. Protein metabolism. In: Sturkie, P.D. ed. Avian physiology. 4th ed. Springer-Verlag New York.Inc. 1986.
- Hamilton, P. Síndrome del ave pálida. VIII ciclo de conferencias internacionales sobre avicultura. AMENA, México. 1987; 207-221
- Hart, S.A. Fowl fecal facts. *World's Poultry Science Journal* 1963; 19: 262-272.
- Klasing, C.K. Comparative avian nutrition. Cab Internacional, New York, NY., USA. 1998.

- Kouwenhoven, B.; Dwars, R.M.; Smeets, J.F.M. Camas húmedas e incremento en la conversión alimenticia, un nuevo problema en pollos de engorda. Curso de actualización sobre problemas de mala absorción en pollos de engorda. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. México DF. México **1993**; 35-43.
- Krogdahl, A. Digestion and absorption of lipids in poultry. *J Nutr.* **1985**, 115, 675-685.
- Leeson, S.; Summers, J.D. Nutrition of the Chicken. 4th ed.; University Books: Guelph, Ontario, Canada, **2001**; 66.
- Lepokvsky, S.; Furuta, F. Lipase in pancreas and intestinal contents of chickens fed heated and raw soybean diets. *Poult. Sci.* **1970**, 49, 192.
- Lewandowski, H.A.; Campbell, W.T.; Harrison, J.G. Clinical chemistries. In: Harrison G.J.; Harrison, R.L. eds. Clinical avian medicine and surgery. Philadelphia W.B. Saunders. Co.**1986**; 192-200.
- Marusich, W.L.; Bauernfeind, J.C. Oxy-carotenoids in poultry feeds. In: Carotenoids as colorants and vitamin a precursors. Ed. Bauernfeind, J.C. Academic Press, New York **1981**.
- McDonald, P.; Edward, R.A.; Greenhalgh, J.F.A.; Morgan, C.A. Animal nutrition. 5nd ed.; Addison Wesley Logman Limited, London, UK. 1995, Traducido por Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España, **1999**.
- Miles R.D. and W.R.Featherston. Uric acid excretion by the chick as an indicator of dietary protein quality. *Poult. Sci* **1976**. 55:98-102,
- Montagne, L.; Piel, C.; Lalles, J.P. Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implication. *Nutr. Rev.* **2004**; 62: 105-114.
- Moran, F. Jr. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and the events through perinatal development. *J. Nutr.* **1985**; 115:665-674.
- Moran, E.T. Jr. Intestinal physiology influencing enteric diseases in fowl. In, Enteric Disease Control. Proceeding of 39th Annual Meeting of American Association of Avian Pathologists. Louisville, Y.K. **1996**; 11-16.
- Morishita, T.Y. Diagnóstico diferencial de varios tipos de diarrea. V Seminario Avícola Internacional, Asociación Académica Santanderiana de Patología Aviar, Cartagena de Indias, Colombia **2000**; 33-35.

- Nimmerfall, F.; Rosenthaler, J. Significance of the goblet-cell mucin layer, the outermost luminal barrier to passage through the gut wall. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1980**; 94: 960-966.
- Nitsan, Z.; Nir, I. A comparative study of the nutritional and physiological significance of raw and heated soya beans in chicks and goslings. *Br. J. Nutr.* **1977**; 37: 81-91.
- North, M.O.; Bell, D.D. Manual de producción avícola: 3ª Ed.: Traducción MVZ Martínez Haro A.F.: Manual Moderno: México, D.F.- Santafé de Bogotá **1993**; 407-453.
- Oliveira, A.C. de; Sgarbieri, V.C. Effect of diets containing dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) on the rat excretion of endogenous nitrogen. *J. Nutr.* **1986**; 116, 2387-2392.
- Palmore, W.P.; Fregly, M.J.; Simpson, C.E. Catecholamine induced diuresis in turkeys. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1981; 167, 1. Citado por Siller WG. Renal pathology of fowl: a review. *Avian Pathol* **1981**; 10: 187-262.
- Pattison M. Problems of diarrhea and wet litter in meat poultry. In, Recent Advances in Animal Nutrition, Harsign, W.; Cole D.J.A. University of Nottingham school of agriculture: Great Britain, **1987**, 320-330.
- Petersen, S.T.; Wiseman, J.; Bedford, M.R. Effects of age and diet on the viscosity of intestinal contents in broilers chicks. *Br Poult Sci* **1999**; 40: 364-370.
- Pusztai, A.; de Oliveira, J.T.A.; Bardocz, S.; Grant, G. Dietary kidney bean lectin-induced hyperplasia and increased polyamine content of the small intestine. En Bog-Hansen, T.C.; Freed, D.L.J. (Eds), Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry, "Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA, **1988**; 6:117-120.
- Pusztai, A. Plant lectins, Cambridge, EDS.; Cambridge University Press: Cambridge, **1991**; 105-164.
- Quintana, J.A. Avitecnia: Manejo de las aves domésticas más comunes. 3º ed. Trillas S.A. de C.V. Mexico, **1999**.
- Ross, J.G.; Christie, G.; Halliday, W.G. Hematological and boold chemistry: comparision values for clinical pathology in poultry. *Vet Rec.* **1978**; 102: 29-31.
- Schiedt, K. Absorption and metabolism of carotenoids in birds, fish and crustaceans. In, Carotenoids vol. 3: Biosynthesis and metabolism. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. Birkäuser Verlag. Basel Switzerland. Boston. Berlin **1998**.

- Scott, M.L.; Nesheim, M.C.; Young, R.J. Nutrition of the chicken, 3th ed., Ithaca, New York, M.L. Scott & Associates. **1982**.
- Sharma, R.; Fernandez, F.; Hinton, M.; Schumacher U. The influence of diet on the mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cell mol. life sci.* **1997**, 53: 935-942.
- Siller, W.G. "Renal Pathology of the Fowl. A Review. *Avian Pathol.* **1981**; 10: 187-262.
- Skadhauge, E. Formation and composition of urine. In: Freeman, B.M. Ed. Physiology and biochemistry of the domestic fowl. Academic Press, London, **1983**.
- Sklan D., P. Budowski, I. Ascarelli and S. Hurwitz. Lipid absorption and secretion in the chick: effect of raw soybean meal. *J. Nutr.* **1973**; 103:1299-1305,
- Sklan, D.; Hurwitz, S.; Budowski P.; Ascarelli, I. Fat digestion and absorption in chicks fed raw or heated soybean meal. *J. Nut.r* **1975**, 105, 57-63.
- Songserm, Th.; Pol, J.M.A.; Van Roozelaar, D.; Kok, G.L.; Wagenaar, F.; Ter Huurne A..A.H.M. A comparative study of pathogenesis of malabsorption syndrome in broilers. *Avian Dis.* **2000**; 44: 556-567.
- Sotelo, A.; González L.A.; González, G.M.T.; Velasco, E., Feria, V.A. Ultrastructural changes of epithelial intestinal cells induced by the ingestion of raw Phaseolus acutifolius. *Nutrition Reports International* **1983**; 27: 329-337.
- Sturkie, P.D. Kidneys, extrarenal salt excretion, and urine. In: Avian physiology. 4th ed. Springer-Verlag New York.Inc. **1986**; 359-382.
- Sunde, M.L. Introduction to the symposium: The scientific way to pigment poultry products. 78th Annual Meeting of the Poultry Science Association, Wisconsin, 1989. Published in *Poult. Sci.* **1992**; 71:709-710.
- Sykes, A.H. Formation and composition of urine. Physiology and biochemistry of the fowl. Vol.1. Bell, D.J.; Freeman, B.M. Eds. New York: Academic Press Chapter 9. Citado por Siller, W.G. Renal pathology of fowl. A review. *Avian Pathol.* **1981**; 10: 187-262.
- Tejada H.I. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Sistema de educación Continua en Producción Animal, A.C. D.F., México. **1992**.
- Tyczkowski, J.K., Hamilton, P.B. Absorption, transport, and deposition in chickens of lutein diester, a carotenoid extracted from marigold (*Tagetes erecta*) petals. *Poult. Sci.* **1986**; 65: 1526-1531.

- Tyczkowski, J.K.; Hamilton, P.B. Altered metabolism of carotenoids during Aflatoxicosis in young chickens. *Poult. Sci.*, **1987**; 66: 1184-1188.
- Tyler, C. The influence of the zero hour and length of time unit on the variation of dry-matter excretions in balance experiments with poultry. *J. Agric. Sci.* **1958**; 51: 243-247.
- Widman, F.R. Jr. Diuresis en aves. VIII Ciclo de Conferencias Internacionales sobre Avicultura. Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal, A.C. México D.F. **1987**.
- Young, D.S. Effects of drugs on clinical laboratory test., 3th ed., Washington, A.A.C.C. Press **1990**.

Cuadro 15. Media \pm error estandar de los parámetros productivos (g) y de la concentración sérica de ácido úrico (mmol/l) de pollos de engorda de 42 días de edad.

Dietas ⁵	Parámetros productivos			
	Ác. úrico ¹ media \pm EE	Consum. alimento ² media \pm EE	Ganancia peso ³ media \pm EE	Índice conversión ⁴ media \pm EE
0%	350 \pm 27.8 ^a	67.33 \pm 2.06 ^{ab}	1787.33 \pm 56.74 ^a	1.54 \pm 0.11 ^e
20%	237 \pm 24.1 ^{bc}	68.27 \pm 2.06 ^a	1732.70 \pm 56.74 ^a	1.61 \pm 0.11 ^{de}
40%	217 \pm 25.2 ^c	61.80 \pm 2.06 ^{bc}	1428.33 \pm 56.74 ^b	1.74 \pm 0.11 ^{cd}
60%	291 \pm 24.1 ^{ab}	63.25 \pm 2.06 ^{abc}	1332.70 \pm 56.74 ^b	1.96 \pm 0.11 ^{bc}
80%	223 \pm 24.1 ^c	60.51 \pm 2.06 ^c	1169.00 \pm 56.74 ^c	2.13 \pm 0.11 ^{ab}
100%	264 \pm 25.2 ^{bc}	49.80 \pm 2.06 ^d	894.00 \pm 56.74 ^d	2.30 \pm 0.11 ^a
$P \leq$ ⁶	**	***	***	**

¹ Concentración sérica promedio \pm error estandar de ácido úrico de 12 pollos por tratamiento a lo 42 días de edad determinados por espectrofotometría con 500 nm de absorbancia (mmol/l).

² Consumo promedio \pm error estandar de alimento (g) por pollo, por día en cada tratamiento, durante 42 días. ³ Ganancia de peso corporal promedio (g) \pm error estandar, por pollo en cada tratamiento al cabo de 42 días ($P \leq 0.001$). ⁴ Promedio \pm error estandar de índice de conversión: relación del consumo de alimento promedio por pollo / promedio de ganancia de peso corporal por pollo al cabo de 42 días ($P \leq 0.01$). ⁵ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. ⁶ Significancia del efecto *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$. Medias en la misma columna con diferente literal fueron significativamente diferentes.

Cuadro 16. Cuadrados medios de los parámetros productivos (g/kg) y de la concentración sérica de ácido úrico (mmol/l) de pollos de engorda de 42 días de edad.

Dietas ⁵	Parámetros productivos									
	Ác. Úrico ¹			Consume alimento ²			Ganancia peso ³		Índice conversión ⁴	
	gl ⁶	CM ⁷	P≤ ⁸	gl	CM	P≤	CM	P≤	CM	P≤
Soya	5	25664	**	5	132.06	**	344943.07	***	0.274	**
Lineal	1	24177		1	513.40	***	1675893.33	***	1.34	***
Cuadrático	1	41608	*							
Residuo	3	30326		4	146.9		48822.02		0.03	
Error	61	6971		17	12.72		9660.22		0.035	

¹ Concentración sérica promedio ± error estándar de ácido úrico de 12 pollos por tratamiento a lo 42 días de edad determinados por espectrofotometría con 500 nm de absorbancia (mmol/l).

² Consumo promedio ± error estándar de alimento (g) por pollo, por día en cada tratamiento, durante 42 días. ³ Ganancia de peso corporal (g) promedio ± error estándar por pollo en cada tratamiento durante 42 días. ⁴ Promedio ± error estándar de índice: relación del consumo de alimento promedio por pollo / promedio de ganancia de peso corporal por pollo a cabo de 42 días. ⁵ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. ⁶ Grados de libertad. ⁷ Cuadrados medios. ⁸ Significancia del efecto *** P≤ 0.001; ** P≤ 0.01; * P≤ 0.05; sin* corresponde a P≥ 0.05.

Cuadro 17. Medias \pm error estandar de la relación de los consumos de agua/alimento (ml/g) entre los días 35 y 42 de edad y del análisis químico de excretas (g/kg) de pollos de engorda de 38 días de edad.

Dietas ⁸	Análisis de excretas ²				
	Agua / Alim. ¹	PC ³	PV ⁴	NNP ⁵	EE ⁶
	Media \pm EE	Media \pm EE	Media \pm EE	Media \pm EE	Media \pm EE
0%	2.84 \pm 0.11 ^a	314.7 \pm 11.6	179 \pm 9.4 ^c	135.7 \pm 8.3 ^a	116.8 \pm 9.7 ^b
20%	2.40 \pm 0.11 ^b	306.7 \pm 11.6	192.6 \pm 9.4 ^{bc}	114.1 \pm 8.3 ^{abc}	128.8 \pm 9.7 ^{ab}
40%	1.93 \pm 0.11 ^c	290.8 \pm 11.6	200.2 \pm 9.4 ^{bc}	90.4 \pm 8.3 ^c	144.9 \pm 9.7 ^{ab}
60%	1.98 \pm 0.11 ^c	332.7 \pm 11.6	216.0 \pm 9.4 ^{ab}	116.7 \pm 8.3 ^{ab}	131.5 \pm 9.7 ^{ab}
80%	1.80 \pm 0.11 ^c	345.6 \pm 11.6	238.8 \pm 9.4 ^a	106.8 \pm 8.3 ^{bc}	167.4 \pm 9.7 ^a
100%	1.98 \pm 0.11 ^c	314.2 \pm 11.6	212.7 \pm 9.4 ^{ab}	101.5 \pm 8.3 ^{bc}	171.0 \pm 9.7 ^a
$P \leq$ ⁹	***		**	*	*

¹ Relación de consumos de agua/alimento promedio \pm error estandar, por pollo, por día entre los días 35 y 42 de edad (ml/g), ($P < 0.001$). ² Análisis químico de 3 muestras de heces por tratamiento tomadas a los 38 días de edad (g/kg). ³ Proteína cruda promedio \pm error estandar en g/kg de heces. ⁴ Proteína verdadera promedio \pm error estandar en g/kg de heces. ⁵ Nitrógeno no proteico promedio \pm error estandar en g/kg de heces. ⁶ Extracto etéreo promedio \pm error estandar en g/kg de heces. ⁸ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. ⁹ Significancia del efecto *** $P \leq 0.001$ ** $P \leq 0.01$ * $P \leq 0.05$; sin * corresponde a $P \geq 0.05$. Medias en la misma columna con diferente literal fueron significativamente diferentes.

Cuadro 18. Cuadrados médios de la relación de los consumos de agua y alimento (ml/g) del día 35 y el 42 de edad y del análisis químico de excretas (g/kg) de pollos de engorda de 38 días de edad.

Dietas ⁷	Agua / Alim. ¹			Análisis de excretas ²							
				PC ³		PV ⁴		NNP ⁵		EE ⁶	
	gl ⁸	CM ⁹	P _≤ ¹⁰	gl	CM	CM	P _≤	CM	CM	P _≤	
Soya	5	0.45	***	5	1123.57	1297.36	*	709.78	*	961.51	*
Lineal	1	1.56	***	1	1044.30	4467.55	***	1190	*	3984.71	**
Cuadrático	1	0.63	**	1	0.13	679.81		666.08		32.94	
Cúbico	1	0.0007		1	3271.80	796.67		843.50		33.85	
Residuo	2	0.04		2	650.81	271.38		424.66		0.455	
Error	12	0.04		12	406.38	263.30		204.98		186.56	

¹ Relación de consumos de agua/alimento promedio ± error estandar, por pollo, por día entre los días 35 y 42 de edad (ml/g), ($P < 0.001$). ² Análisis químico de 3 muestras de heces por tratamiento tomadas a los 38 días de edad (g/kg). ³ Proteína cruda promedio ± error estandar en g/kg de heces. ⁴ Proteína verdadera promedio ± error estandar en g/kg de heces. ⁵ Nitrógeno no proteico promedio ± error estandar en g/kg de heces. ⁶ Extracto etéreo promedio ± error estandar en g/kg de heces. ⁷ Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. ⁸ Grados de libertad. ⁹ Cuadrados medios. ¹⁰ Significancia del efecto *** $P \leq 0.001$ ** $P \leq 0.01$ * $P \leq 0.05$; sin * corresponde a $P \geq 0.05$. Medias en la misma columna con diferente literal fueron significativamente diferentes.

Cuadro 19. Medias de consumo total de pigmento (mg) por pollo, del área cutánea, de la densidad óptica de la concentración sérica de xantofilas y de la pigmentación cutánea (escala CIE Lab.) a los 42 días de edad.

Dietas ⁸	Consumo pigmento ¹	Área cutánea ²	Xantofilas séricas ³	Pigmentación cutánea ⁴		
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	L ⁵ ± EE	a ⁶ ± EE	b ⁷ ± EE
0%	170 ± 4.51 a	153 ± 3.67 a	0.12 ± 0.029 bc	67 ± 0.96	10 ± 0.78	32 ± 2.13 c
20%	175 ± 1.45 a	150 ± 3.67 a	0.10 ± 0.029 c	69 ± 0.88	8 ± 0.71	39 ± 1.94 ab
40%	151 ± 3.51 ab	132 ± 3.67 b	0.18 ± 0.039 abc	68 ± 0.92	9 ± 0.74	35 ± 2.03 bc
60%	159 ± 8.45 ab	126 ± 3.67 b	0.16 ± 0.034 bc	69 ± 0.88	9 ± 0.71	42 ± 1.94 a
80%	150 ± 6.11 ab	116 ± 3.67 bc	0.19 ± 0.031 ab	69 ± 0.88	8 ± 0.71	37 ± 1.94 abc
100%	127 ± 5.45 b	97 ± 3.67 c	0.27 ± 0.031 a	69 ± 0.92	7 ± 0.74	38 ± 2.03 abc
$P \leq^9$	**	**	**			*

¹Consumo total promedio ± error estandar de pigmento por pollo durante 21 días con dieta de finalización (mg). ²Área cutánea promedio ± error estandar = $P^{0.67}$ con base en el fundamento de que en los cuerpos de la misma forma y de igual densidad, el área de la superficie es proporcional al peso elevado a la potencia tres cuartos. ³Concentración de xantofilas séricas promedio ± error estandar, de 6 pollos por tratamiento a los 42 días de edad, determinada por espectofotometría líquida con 480 nm de absorbancia. ⁴Pigmentación cutánea promedio ± error estandar de 10 pollos por tratamiento a los 42 días de edad determinada en forma individual con un colorímetro de reflectancia Minolta CR300. ⁵Luminosidad, ⁶enrojecimiento, ⁷amarillamiento de la escala CIE Lab. ⁸Porcentajes de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI en las dietas experimentales. ⁹Significancia del efecto ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$; sin * corresponde a $P \geq 0.05$. Medias en la misma columna con diferente literal fueron significativamente diferentes.

IX.- CONCLUSIONES DEL PROYECTO

1. La SBA tuvo efecto perjudicial dosis respuesta para los pollos de engorda, sobretodo cuando la concentración en la dieta fue superior a 3196 $\mu\text{g/g}$.
2. Las lesiones asociadas a la interacción de SBA con la membrana y su presencia en el citoplasma de los enterocitos de pollo de engorda, son semejantes a las inducidas por otras lectinas en otros modelos experimentales.
3. Ni la SBA, ni los demás factores antinutricionales de la SCI, provocaron mayor consumo de agua, siendo que el mayor consumo de agua guardó relación con mayor peso corporal, mayor consumo de alimento y con el aspecto desmoronado y aspecto acuoso de las excretas.
4. Ni el efecto de la SBA ni el consumo de SCI, puede ser considerados en la patogenia del STR, como responsables de las camas húmedas por no haber provocado poliuria debido a polidipsia, ni diuresis por disfunción renal ya que no provocó uremia.
5. La SBA si podría tener algún papel en el desarrollo del STR en cuanto a:
 - a) La excreción del moco observado en las deyecciones de aves que sufren dicho síndrome, ya que indujo hiperplasia de células caliciformes con efecto dosis respuesta.
 - b) La ganancia de peso deficiente, ya que se vió asociada a atrofia de las vellosidades, a hiperplasia y displasia del epitelio intestinal y a alteraciones ultraestructurales en los enterocitos, que comprometen la sobrevivencia de estas células y la funciones de digestión / absorción.
7. La SBA, junto con los demás factores antinutricionales de la SCI, intervinieron en el aprovechamiento deficiente de los nutrientes, puesto que provocaron indigestión de proteínas ya que por cada 20% de sustitución de proteína de PSD por proteína de SCI, se incrementó linealmente la concentración de proteína verdadera en excretas.
8. La ingestión de SCI se vió asociada a hipertrofia nodular del páncreas, lesiones gástricas, y probablemente mayor permeabilidad del conducto entre molleja y duodeno lo que permitió el paso de partículas de alimento indigestas, al tubo digestivo.
9. Sin embargo, la ingestión de SCI y las lesiones asociadas a la interacción de la SBA con el epitelio intestinal, no interfirieron en la absorción de xantofilas y contrariamente a

lo observado en el STR, se incrementó paulatinamente la concentración de xantofilas en suero y la pigmentación cutánea.

10. Los resultados obtenidos por medio de inmunohistoquímica anti-SBA, sugieren que probablemente en el pollo de engorda:

- a) Solo las células maduras de las vellosidades intestinales presentan el receptor GalNac/Gal para la SBA y no así las células indiferencias de las criptas de Lieberkühn.
- b) Que la SBA al igual que otras lectinas, induce la producción de anticuerpos Ig A y que esta sea la razón por la cual la reacción inmunohistoquímica anti-SBA haya sido apreciada invariablemente en el citoplasma, pero no siempre en las microvellosidades de los enterocitos del ápice y del tercio medio de las vellosidades intestinales del pollo de engorda
- c) Que la SBA probablemente circula en el torrente sanguíneo del pollo de engorda y que probablemente, las células β secretoras de insulina presenten el receptor GalNac/Gal, razón por la cual fue observada reacción inmunohistoquímica anti-SBA muy intensa en algunos islotes de Langerhans y leve en otros.
- d) Que la interacción de la SBA con la membrana de algunas de las células de los islotes de Langerhans, a juzgar por los resultados de la histología y la inmunohistoquímica anti-SBA realizados en páncreas de pollos de engorda, pudiera jugar algún papel en la síntesis o secreción de insulina.

X.- PROSPECTIVAS

Las posibles etapas que continuarían en esta línea de investigación:

1. .Evaluar el efecto de la SBA en forma independiente suministrando a las aves extractos purificados de esta lectina.
2. Comprobar la posibilidad de que la SBA, esté implicada junto con los factores antitripsicos de la soya en el desarrollo de las lesiones observadas en el parénquima exócrino del páncreas de pollo de engorda, para esclarecer el efecto perjudicial de la SCI en el desempeño productivo de estos animales

3. Corroborar que en aves la SBA incrementa la concentración sérica de poliaminas y que estas son responsables de mayor liberación de CCK a nivel intestinal, para determinar si estos dos elementos intervienen en el desarrollo de hipertrofia del páncreas exocrino como sugieren los resultados de **Jordinson, M.**; Playford, R. J.; Calam, J. Effects of a panel of dietary lectins on cholecystokinin release in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **1997**; 273: 946-950; **Pusztai, 1991**; **Pusztai y col., 1996** y que por medio de este mecanismo se genera proventriculitis y erosión de molleja, que son lesiones muy frecuente en el pollo de engorda y que seguramente influyen en la digestión / absorción y por consiguiente en el desempeño productivo de las aves.
4. Determinar si la SBA se encuentra en el torrente sanguíneo de las aves que consumen SCI y si ésta interactúa con la membrana celular de las células β de los islotes de Langerhans, por lo que estas células sufren alteraciones que inhiben la síntesis o secreción de insulina.
5. Determinar el mecanismo por medio del cual la SBA provoca atrofia de las vellosidades a pesar de que es responsable de hiperplasia e incluso de displasia del epitelio.

The Effect of Raw Full-Fat Soybean and Its Lectin on the Nutrition and Pigmentation of Broilers

MARIA TERESA CASAUBON-HUGUENIN,^{*,†} ERNESTO ÁVILA-GONZÁLEZ,[‡]
 CARLOS VAZQUEZ-PELAEZ,[§] FRANCISCO TRIGO,^{||} RICARDO LASCURAIN,[⊥] AND
 EDGAR ZENTENO[#]

Departamentos de Producción Animal: Aves, Genética y Bioestadística, Patología, and Bioquímica and Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, Mexico, and Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan, 14450, Mexico

This study was aimed at determining the effect of raw full-fat soybean in the digestion/absorption of broilers and to evaluate the role of soybean agglutinin (SBA) in the pathogenesis of the runting and stunting syndrome of broilers. Six broiler groups were fed with six experimental diets for 42 days in which the defatted soybean meal of the basal diet was substituted with increasing raw full-fat soybean percentages ranging from 0 to 100%. The results suggested that SBA included in the raw full-fat soybean can play a role in the pathogenesis of the runting and stunting syndrome in broilers since binding and incorporation of SBA to enterocytes were associated with hyperplasia and dysplasia of the intestinal epithelium, as suggested by the progressive increases ($P < 0.001$) of mitosis/crypt in the duodenum and in the midintestine, as well as by intestinal villi atrophy ($P < 0.001$) in the duodenum and the midintestine. Indigestion and malabsorption of proteins induced progressive low weight gain ($P < 0.001$) up to 50% with 100% of raw full-fat soybean in the diet at 42 days. Xanthophylls in serum and skin yellowness were enhanced linearly in the broilers fed 42 days with increasing percentages of raw full-fat soybean in the diet. Increased xanthophylls absorption and decreased protein absorption can be caused by pathological changes in the epithelial intestine triggered by SBA binding and internalization.

KEYWORDS: Broiler; raw full-fat soybean; soybean agglutinin; *Glycine max*; intestine; immunohistochemistry; feces; pigmentation; growth

INTRODUCTION

The "runting and stunting syndrome" (RSS) or "malabsorption or feed passage syndrome" gives rise to considerable economic losses in aviculture worldwide. This syndrome is characterized by reduced weight gain and increased feed conversion due to indigestion and poor absorption of proteins and xanthophylls, thus increasing production costs (1–3). The pathogenesis of RSS has not been fully elucidated (4–8). Because the soybean agglutinin (SBA) is an antinutritional factor

from soybean and residual concentrations of it have been found in the commercially processed defatted soybean meal (DSM) extensively used in poultry feed, it is important to assess whether, even in small doses, SBA has a detrimental effect on the intestine of broilers (9). It has been suggested that SBA has a deleterious effect on skin pigmentation, as occurs in RSS, by injuring the intestinal mucosa and by increasing lipids catabolism (8, 10). Mucus hypersecretion caused by SBA could hinder pigment absorption since the mucus from the glycocalyx–microvilli network acts as a three-dimensional barrier that excludes all particles and restricts diffusion of large molecular weight compounds (11, 12).

The aim of this study was to assess the effect of raw full-fat soybean (RFFS) and the role of SBA in the digestion/absorption function of broilers and to determine whether the latter could play a role in the pathogenesis of RSS. Weight gain, feces analyses, and serum xanthophylls concentrations were determined to assess the RFFS's effect on the digestive and absorptive intestinal function. Immunohistochemistry was used to determine SBA binding to the microvilli and to broiler

* To whom correspondence should be addressed. Tel/Fax: +52(55)56-22-58-67. E-mail: casaubon@servidor.unam.mx.

[†] Departamento de Producción Animal: Aves, Universidad Nacional Autónoma de México.

[‡] Centro de Enseñanza, Universidad Nacional Autónoma de México.

[§] Departamento de Genética y Bioestadística, Universidad Nacional Autónoma de México.

^{||} Departamento de Patología, Universidad Nacional Autónoma de México.

[⊥] Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

[#] Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México.

Table 1. Calculated Analysis of the Main Nutrients (%) from the Starter and Finisher Diets for Each Experimental Group

% raw full fat soybean in diets	starter diets (0–21 days) experimental groups						finisher diets (22–42 days) experimental groups					
	0	20	40	60	80	100	0	20	40	60	80	100
CP	22	22	22	22	22	22	20	20	20	20	20	20
crude fat	6	6.1	8.5	9.3	10.1	11	7	12	12	12	12	12
calcium	1	1	1	1	1	1	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
available phosphorus	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
metabolizable energy (kcal/kg)	3050	3050	3050	3050	3050	3050	3050	3050	3050	3050	3050	3050
methionine + cystine	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
lysine	1.2	1.3	1.3	1.2	1.4	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	1.2	1.3
linoleic acid	2.2	2.34	3.89	4.01	4.39	4.84	2.68	5.53	5.50	5.48	5.45	5.42

enterocyte's cytoplasm, while histopathology was used to determine the deleterious effect of SBA on the intestinal mucosa and on the length and epithelial proliferation of duodenum and midintestine villi. Skin yellowness was assessed to determine the RFFS effect on the skin pigmentation.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Procedure. Avian Farm × Arbor Acre 1 day old chicks ($n = 180$) of either sex, weighing 36 ± 10 g, were used in six experimental diets. Three groups of 10 chicks each ($n = 30$) were fed with each experimental diet and housed in Petersime battery cages with water and food ad libitum for 42 days. Twelve diets containing sorghum and commercial DSM were formulated as follows: starter diets for the first 21 days and finisher diets for the last 21 days, as established by Cuca et al. (13), using the Carlos and Carlos NUTRION III program (14). All diets were isoproteic with 22 and 20% of crude protein (CP) for starter and finisher diets, respectively, and isocaloric with 3050 kcal/kg of metabolizable energy. For the experimental diet, the DSM was substituted by increasing the percentages of RFFS. The negative control diet contained 0% of RFFS, and each successive diet contained 20% more RFFS, with 100% RFFS for the sixth diet (Table 1). The DSM was obtained from the Facultad de Veterinaria y Zootecnia (Mexico), and the soybean was dehulled, cracked, flaked, and hexane extracted. Then, the flakes were transferred to the desolventize toaster unit where the remainder of the solvent was recovered, and the flakes were subjected to steam heat to inactivate the soybean growth inhibitors. To prepare the RFFS meal, soybeans from a Mexican cultivar were ground until a 20 mesh flour size, thus retaining the full amount of fat. The finisher diets were supplemented with 70 mg of xanthophyll from *Tagetes erecta* petals (Marigolds or Cempasuchil flowers) (Hi-Gold 60 pigment, Industrial Organica, Monterrey, Mexico) per kilogram of meal.

Characteristics of DSM, RFFS, and Experimental Diets. Urease activity, hemagglutinating activity, and SBA concentration in the DSM, RFFS, and experimental diets were determined in the soybean products used. Urease activity values were determined by the Hayward's method (15) and following the AOAC 1990 protocol (16). The saline extraction of proteins from the soybean flours, used to determine the hemagglutinating activity and presence of SBA by immunodiffusion assays, was performed as described in ref 6: dry flour was suspended in 0.15 M NaCl at 10% (w:v) and stirred for 2 h, the pH was adjusted to 4 with 4 M acetic acid, and the mixtures were allowed to stand overnight at 4 °C. The supernatant was obtained by centrifugation at 3000 rpm for 15 min. The hemagglutination titer of the saline extracts was determined with a 1% suspension of rabbit erythrocytes in PBS, pH 7.2, by the 2-fold serial dilution, and the result was reported as the reciprocal of the last 2-fold dilution showing visible agglutination. The hyperimmune anti-SBA serum was obtained from an adult New Zealand male rabbit weighing 3.5 kg, by inoculating 3 mg of SBA (Sigma Chemical, St. Louis, MO) in 6 mL of PBS and 1:1 complete Freund adjuvant. The emulsion (500 μ L) was subcutaneously injected four times in the dorsal thoracic area at 7 day intervals. The rabbit was immunized two times more at 2 month intervals, and 7 days after the last inoculation, the inhibition of the hemagglutination titer was 1:32 768. The rabbit was killed by decapitation and bled; the serum was stored at -70 °C until

use. The concentration of SBA in the DSM, RFFS, and experimental diets was determined by Rocket immunoelectrophoresis (17) in 2% agarose gel and using different SBA concentrations (Sigma) as standards. The test was validated by the standard curve of different SBA dilutions beginning with 1 mg/mL of SBA in PBS, pH 7.2.

Productivity Parameters. Mortality, averages of feed intake, and body weight gain per chick were registered weekly along the 42 days to calculate feed conversion.

Feces Analysis. Three fecal samples from each experimental diet were obtained at 38 days, to determine the SBA effect on the digestive/absorptive intestinal function. The excretion of CP was determined by the Kjeldahl method (16). Because CP or total nitrogen in bird feces contains only 15% of true protein (TP) that has been neither digested nor absorbed and 85% of nonprotein nitrogen (NPN), corresponding to urine products and other wastes from the intestinal tract, in the present study, the contents of TP in feces were estimated by subtracting the NPN value from CP (18). The lipid excretion or ether extract (EE) was determined in two samples per treatment from the same feces based on the relation existing between lipids and xanthophyll absorption. The CP content was determined by the Kjeldahl method, NPN by the trichloroacetic acid method, and EE using the AOAC (16) and protocol of Tejada (19).

Histological Procedure. The effect of SBA and its presence in the intestinal mucosa was evaluated by histopathological analysis and by immunohistochemistry. At the end of the experimental period, a necropsy of nine chickens per treatment was performed after desensitization and euthanasia by means of an electric current passed from the oral cavity to the cloacae mucosa. One centimeter long transversal sections from the midduodenum in the ascendant and descendant portions of the duodenal loop and from the midintestine region near Meckel's diverticulum were taken from each chicken. The samples were buffer-formalin-fixed for 24 h, paraffin-embedded (Paraplast X-TRA Oxford Labware, St. Louis, MO, fusion between 50 and 54 °C), and sectioned at 3–4 μ m thickness (20). Histopathological analysis was performed on hematoxylin-eosin-stained paraffin sections from each duodenum and midintestine tissue sample. This allowed us to measure villi length and to assess the epithelial hyperplasia by the number of mitoses in the Lieberkühn crypts (20). These studies were performed with a photonic Leica Gallen III microscope with a 10× ocular lens and a reticular lens with 20 squares per side. By means of a micrometer slide, each subdivision was set at 185.7 μ m per side, with the 4× objective lens; 75 μ m with the 10× objective lens; and 18 μ m with the 40× objective lens. The duodenal villi were measured with the 4× objective lens, and those of the midintestine were measured with the 10× objective lens to include, in both cases, the entire villi area. Ten villi per chick were measured. To evaluate epithelial hyperplasia, the number of mitoses in 10 crypts per chick were counted. Only the mitoses within the visual field of the 100× objective lens were counted, placing the lower border of the crypt over the optical field perimeter.

The presence of SBA was determined by immunohistochemical analysis on paraffin sections from the duodenum and midintestine of both control and RFFS-fed chickens (EnVision+ System, Peroxidase (DAB), Rabbit; Dako Corporation, Carpinteria, CA). For negative controls, paraffin sections were incubated with nonimmunized rabbit serum in place of the primary antibody. The entire immunostaining procedure was performed at room temperature. The primary antibody

was rabbit hyperimmune serum against SBA. The paraffin of the tissue sections was removed with xylene and alcohol before blocking the tissue peroxidase with 0.03% H₂O₂ for 15 min. The tissue sections were washed for 10 min with PBS and incubated with proteinase K (Dako) for 15 min, which was removed by shaking the slides. The tissue sections were incubated with a 1:800 primary antibody dilution for 30 min and washed with PBS; thereafter, the peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit antibody (Dako) was applied for 30 min. The color was developed with 3,3'-diaminobenzidine solution containing H₂O₂ (Dako) for 8 min. The samples were counterstained with hematoxylin.

Pigmentation. To evaluate the effect of SBA on the pigmentation process at the end of the experimental period, the absorption and tissue deposition of xanthophylls were measured by determining serum xanthophylls concentration and skin yellowness, respectively. Serum xanthophylls were measured in six broilers per experimental diet in a 1:10 serum and acetone solution, using a Milton Roy spectronic 20D spectrophotometer, at 480 nm of liquid absorbance, following the method described by Allen et al. (21). Skin pigmentation was evaluated in 10 live broilers per experimental diet, over a period of 2 h, using a Minolta CR300 chromometer at the featherless area of the body found near the most caudal rib. Serum xanthophylls and skin yellowness values were evaluated in relation to the total xanthophyll intake and total body skin area, which was estimated by means of body weight to the two-thirds power ($W^{0.67}$), according to Mc Donald et al. (22).

Statistical Analysis. The means of all results were compared by variance analysis and Tukey's test. Regression analysis was obtained by the minimum squares test and by Pearson's linear correlation (SAS, vers. 8 program, 1999). The model used was $Y_{ij} = \mu + R_i + S_j + \epsilon_{ij}$, where Y_{ij} was the effect of each (j -th) random observation for each characteristic, associated to each (i -th) soybean percentage, μ was the population mean, R_i was the effect on each experimental group of birds fed with different soybean percentages, S_j was the effect of each (i -th) soybean percentage, and ϵ_{ij} was the random error, NID.

RESULTS AND DISCUSSION

Characteristics of DSM and RFFS Contained in the Diets.

The characteristics of the soybean flour used were satisfactory for this study. The urease activity was 0.29 for DSM vs 2.3 for RFFS (which had not been heated), indicating that the stream heat process was allowed to inactivate the urease activity, but maintained active the hemagglutinating activity of SBA (23, 24). The hemagglutination titer of the DSM saline extract was 1:3 200; of RFFS, the hemagglutination titer was 1:25 600; and of the purified SBA (1 mg/1 mL), it was greater than 1:204 800. The SBA contents in RFFS and DSM used in the formulation of diets were 5658 and 884 $\mu\text{g/g}$, respectively; 756 $\mu\text{g/g}$ in the 0% diet, 1034 $\mu\text{g/g}$ in the 20% diet, 2447 $\mu\text{g/g}$ in the 40% diet, 2747 $\mu\text{g/g}$ in the 60% diet, 3196 $\mu\text{g/g}$ in the 80% diet, and 3667 $\mu\text{g/g}$ in the 100% diet, in relation to the peak height of antigen concentration in the standard curve used for the Rocket immunoelectrophoresis, which decreased ($P < 0.01$) following the equation $Y = -1.6553 + 0.5711 S$, where $R^2 = 0.8023$.

Productivity Parameters and Feces Analyses. Mortality for the whole experiment was 1.1%, one from the 0% RFFS group at day 4 and another in the 100% RFFS group at day 19; thus, the death of these chicks is not attributable to a treatment effect. As increments of 20% DSM were substituted by RFFS, the food intake decreased ($P < 0.001$) according to the following equation: $Y = 67.07 + 0.036 S + 0.002 S^2$ with $R^2 = 0.7139$ until the 90% substitution level, and then, the values fell; the weight gain decreased ($P < 0.001$) according to the equation $Y = 1837.33 - 8.93 S$ with $R^2 = 0.9105$, and the feed conversion increased ($P < 0.001$) according to the equation $Y = 1.4847 + 0.01 S$ with $R^2 = 0.7454$ (Table 2). The linear negative effect on weight gain ($P < 0.001$) when DSM was substituted by increasing percentages of RFFS (Table 2) has been attributed

Table 2. Productive Parameters (g) from Broilers at Day 42^a

experimental diets	productive parameters (mean \pm SE) ^b		
	feed intake (g) ^c	body weight gain (g) ^d	feed conversion (g) ^e
0%	67.33 \pm 2.06 ^{ab}	1787.33 \pm 56.74 ^a	1.54 \pm 0.11 ^e
20%	68.27 \pm 2.06 ^a	1732.70 \pm 56.74 ^a	1.61 \pm 0.11 ^{de}
40%	61.80 \pm 2.06 ^{bc}	1428.33 \pm 56.74 ^b	1.74 \pm 0.11 ^{cd}
60%	63.25 \pm 2.06 ^{abc}	1332.70 \pm 56.74 ^b	1.96 \pm 0.11 ^{bc}
80%	60.51 \pm 2.06 ^c	1169.00 \pm 56.74 ^c	2.13 \pm 0.11 ^{ab}
100%	49.80 \pm 2.06 ^d	894.00 \pm 56.74 ^d	2.30 \pm 0.11 ^a
$P \leq g$	***	***	**

^a Superscript letters a–e: means in the same column with different superscripts were significantly different. ^b Means \pm standard error. ^c Daily average of feed intake (g) per chick, in each treatment, over 42 days ($P < 0.001$). ^d Body weight gain per chick with each treatment, over 42 days, minus the mean body weight at day 1 (g) ($P < 0.001$). ^e Relation of feed intake per chick/body weight gain per chick at day 42 ($P < 0.01$). ^f Experimental diets with increasing percentage of RFFS. ^g Significance of effects: *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; without * corresponds to $P \geq 0.05$.

Table 3. Chemical Analytes of Feces (g/kg) from Broilers at Day 38^a

experimental diets	chemical analytes of feces ^b (mean \pm SE) ^c			
	CP ^d	TP ^e	NPN ^f	EE ^g
0%	314.7 \pm 11.6	179 \pm 9.4 ^c	135.7 \pm 8.3 ^a	116.8 \pm 9.7 ^b
20%	306.7 \pm 11.6	192.6 \pm 9.4 ^{bc}	114.1 \pm 8.3 ^{abc}	128.8 \pm 9.7 ^{ab}
40%	290.8 \pm 11.6	200.2 \pm 9.4 ^{bc}	90.4 \pm 8.3 ^c	144.9 \pm 9.7 ^{ab}
60%	332.7 \pm 11.6	216.0 \pm 9.4 ^{ab}	116.7 \pm 8.3 ^{bc}	131.5 \pm 9.7 ^{ab}
80%	345.6 \pm 11.6	238.8 \pm 9.4 ^a	106.8 \pm 8.3 ^{bc}	167.4 \pm 9.7 ^a
100%	314.2 \pm 11.6	212.7 \pm 9.4 ^{ab}	101.5 \pm 8.3 ^{bc}	171.0 \pm 9.7 ^a
$P \leq h$		**	*	*

^a Superscript letters a–c: means in same column with different superscripts were significantly different. ^b Chemical analytes of three samples of feces from each treatment taken at day 38 (g/kg). ^c Mean \pm standard error. ^d CP $P > 0.05$. ^e TP ($P < 0.01$). ^f NPN ($P < 0.05$). ^g EE of two samples of feces from each treatment taken at day 38 (g/kg). ^h Significance of effects: ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$; without * corresponds to $P \geq 0.05$.

to both the lectins and the antitrypsic effects present in the RSS (25). Duke (26) considered that the pathogenicity of SBA on the intestinal epithelium could inhibit trypsin production because it impedes secretion of enterokinases by enterochromaffin cells located in the crypts of Lieberkühn (26, 27). However, Balloun (25), Baintner (28), and Douglas et al. (29) concluded that rather both antitrypsic factors, i.e., the Kunitz that blocks only trypsin and the Bowman–Birk that inhibits trypsin and α -chymotrypsin, are responsible for the deficient weight gain instead of SBA.

In this study, despite a lack of significant ($P > 0.05$) findings in feces in regard to CP or total nitrogen, the deficient weight gain with increased RFFS in the diet was associated with an increase of TP in feces ($P < 0.001$) according to the equation $Y = 182.04 + 0.41 S$ with $R^2 = 0.5099$ (Table 3). This result suggests that protein digestion was worst as the RFFS percentage increased, as had been observed by Bielora et al. (18). Coates et al. (30) point out that at greater weight gain, the food intake is greater, such that there is greater excretion of NPN if all of the protein contained in the diets is absorbed and metabolized. The decreased content of NPN in feces observed in the present study could be due to the decreased food intake ($P < 0.001$) observed when increased RFFS quantities were added to the diet (Table 3). These authors attributed the decreased weight gain largely to SBA, based on their observation that the addition of a Kunitz inhibitor reduced broiler growth by 6% in average, whereas weight gain was reduced in 43.5% by RFFS addition, when compared to broilers receiving adequately cooked DSM. Consequently, these authors concluded that the proteases in



Figure 1. Tip of duodenum villi from a chicken fed with 100% RFFS in the diet. The SBA is shown inside the cellular cytoplasm (arrow); immunostain; bar = 35 μm .

soybean play a minor role in the deficient growth of broilers. Physiologically, the broiler's intestine secretes enterokinases that then convert the trypsinogen secreted by the pancreas to trypsin, which, in turn, stimulates intestinal pancreatic secretions to secrete intestinal enterokinases.

On the other hand, the NPN diminished ($P > 0.05$) according to $Y = 119.74 - 0.23 S$ with $R^2 = 0.1556$ (Table 3). In fowl feces, the quantity of CP or total nitrogen obtained by the Kjeldahl method is made up of two fractions: TP, corresponding to the not used protein, be it through indigestion or malabsorption; and NPN, the fraction made up of uric acid, ammonium, ammonium acids, urea, and creatinine, which are the products of protein metabolism and bacterial fermentation (31). The increased NPN values in rats fed with *Phaseolus vulgaris* meal, containing *P. vulgaris* agglutinin, suggested increased muscular catabolism (32). In contrast, in our study, muscular catabolism seems to be improbable since NPN values decreased with increasing RFFS intake.

Histological Results. The enterocytes membrane of broilers seems to possess oligosaccharides containing GalNAc/Gal, which are receptors specifically recognized by SBA. The immunohistochemical analysis showed positive SBA recognition in the 0% RFFS control group, as well as in all broilers from the experimental groups at 42 days. The presence of SBA in the 0% RFFS control group indicates a residual SBA content in the commercial DSM (9). SBA identified in the 42 days old chicks was homogeneously distributed over the entire villi epithelium, except in the Lieberkühn crypts. These results show that the glycoprotein receptors recognized by SBA are present only in mature cells since the Lieberkühn crypts are made up of progenitor, undifferentiated, or embryonic cells (11). The positive SBA reaction was observed in the cellular cytoplasm in all cases and in the microvilli in 50% of the experimental chicks (Figures 1, 2 and 3). As demonstrated in other animal lectin models, SBA adheres to the enterocyte membrane and is internalized by pinocytosis (7, 8, 10). The presence of SBA within the cytoplasm of enterocytes induced hyperplasia of the intestinal epithelium confirmed upon finding a linear increase ($P < 0.001$) of 6.8 mitoses per crypt in the duodenum for each 20% of DSM substitution, as described by the equation $Y =$

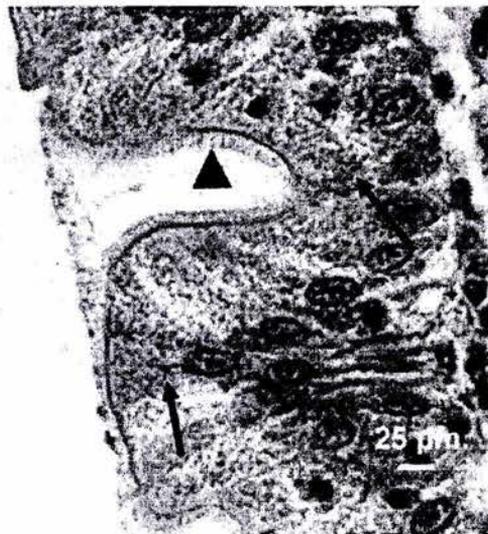


Figure 2. Epithelium of midgut villi from a chicken fed 60% RFFS. The epithelial fold with superimposed cells due to hyperplasia shows brown SBA particles in the cellular cytoplasm (arrow) but not in the microvilli (arrowhead); immunostain; bar = 25 μm .

Table 4. Mitoses Per Crypt and Length of Villi in the Duodenum and Midintestine of Broilers at Day 42^a

experimental diets	amount of mitoses per crypt (mean \pm SE) ^b		length of villi (mean \pm SE) ^c	
	duodenum ^d	midintestine	duodenum ^e	midintestine
0%	20.95 \pm 2.17 ^e	13.94 \pm 1.60 ^e	2053.48 \pm 30.67 ^a	1028.87 \pm 14.60 ^a
20%	28.05 \pm 2.61 ^{de}	19.33 \pm 1.60 ^b	1983.90 \pm 28.91 ^a	1072.88 \pm 13.75 ^b
40%	33.17 \pm 2.61 ^{cd}	18.72 \pm 1.60 ^b	1907.46 \pm 25.44 ^b	928.75 \pm 14.20 ^c
60%	36.39 \pm 2.61 ^c	17.55 \pm 1.60 ^b	2005.16 \pm 31.19 ^a	892.28 \pm 13.40 ^{cd}
80%	46.40 \pm 2.71 ^b	21.44 \pm 1.60 ^{ab}	1829.39 \pm 29.03 ^c	859.28 \pm 15.00 ^d
100%	60.24 \pm 2.91 ^a	22.05 \pm 1.60 ^a	2046.50 \pm 37.93 ^a	797.22 \pm 14.10 ^e
$P \leq$	***	***	***	***

^a Superscript letters a–e: means in same column with different superscripts were significantly different. ^b Mean of amount of mitoses per crypt in the duodenum and midintestine \pm standard error. ^c Mean of villous length in duodenum and midintestine \pm standard error. ^d Amount of mitoses in 10 crypts per chicken from nine chickens per treatment at 42 days in the duodenum and midintestine. ^e Length of 10 villi in the duodenum and midintestine from nine chickens per treatment at 42 days. ^f Significance of effects: *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$; without * corresponds to $P \geq 0.0$.

$19.91 + 0.34 S$, where $R^2 = 0.5876$, and 1.3 mitoses per crypt in the midintestine, as described by the equation $Y = 15.58 + 0.065 S$, where $R^2 = 0.0981$ (Table 4). A similar effect has been documented in rats with other lectins (4, 6–8) where histology of the intestines showed that the hyperplasia was affecting not only the enterocytes but also the mucus-producing cells. Furthermore, Oliveira et al. observed, in rats, that the continuity of the enterocyte brush border is not altered and neither ulceration nor villi collapse occurs with exposure of the lamina propria (10). Whereas the normal intestinal epithelium presented as a continuous ribbon with uniform parallel cells in the histological sections of this study, epithelial hyperplasia was evidenced by the discontinuity of the villi epithelium with severalfolds of heaped cells conferring a fernlike shape (Figure 4). This phenomenon can be explained by the mitogenic effect of SBA causing an unbalance in the physiological renovation process of the villi epithelium determined by antagonistic enzymes that could stimulate or inhibit the proliferation of undifferentiated cells located in the Lieberkühn crypts (8). Even though mitosis

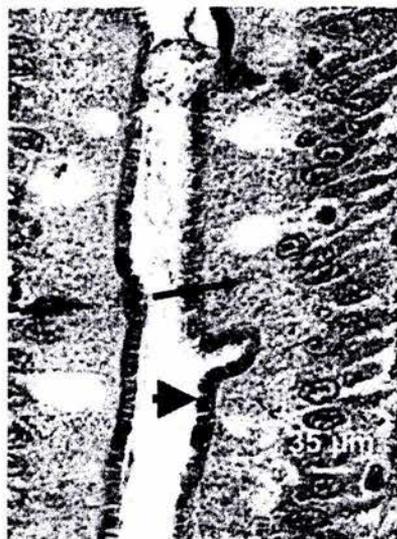


Figure 3. Epithelium of midgut villi from a chicken fed 60% RFFS in the diet. The epithelium does not show hyperplasia. There are brown SBA particles in both the cellular cytoplasm (arrow) and the microvilli (arrowhead); immunostain; bar = 35 μm .

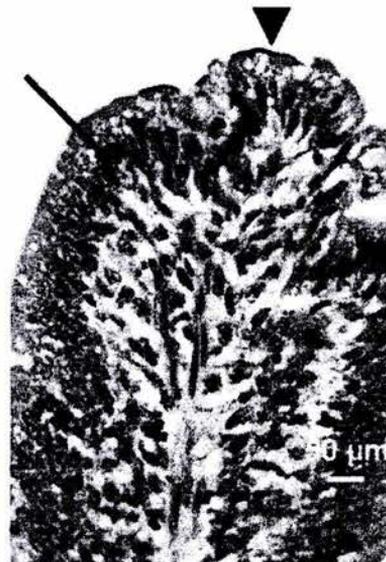


Figure 5. Midgut villi from a chicken fed 100% RFFS in the diet. The upper third of villi shows epithelial dysplasia (arrow). The villi tip does not show desquamation (arrowhead); hematoxylin and eosin; bar = 50 μm .

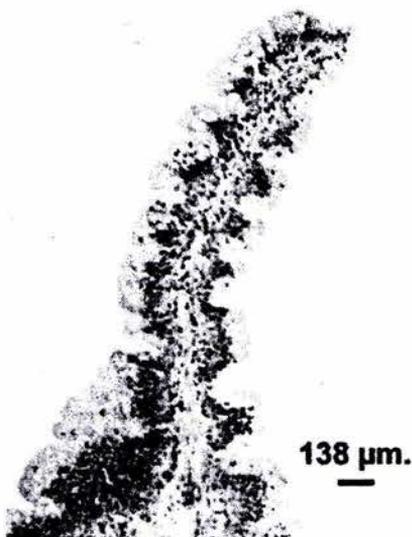


Figure 4. Villi of duodenum from a chicken fed 60% RFFS. Hyperplasia of the epithelium with several folds confers a fermlike shape to the villi; hematoxylin and eosin; bar = 138 μm .

in the crypt increased linearly, the hyperplasia viewed in the histological sections was only seen with SBA, contained in RFFS at concentrations between 884 and 2 747 $\mu\text{g/g}$ (in treatments ranging from 0 to 60%). Conversely, the 80 and 100% treatments, in which the SBA concentration ranged from 3196 to 3667 $\mu\text{g/g}$, hyperplasia was substituted by dysplasia along the entire epithelium, even at the tip of the villi, which did not show desquamation (extrusion) of the cells. This dysplasia was characterized by a continuous epithelium made up of disordered layering of numerous cells with morphological characteristics that are true of immature embryonic cells normally found in the crypts of Lieberkühn. These cells presented oval or rounded nuclei of variable size, although very large occasionally, dispersed and hyperchromatic chromatin, one or two large and very apparent nucleoli, and an increase in the nucleus-to-cytoplasm ratio (Figures 5 and 6). Dysplasia is

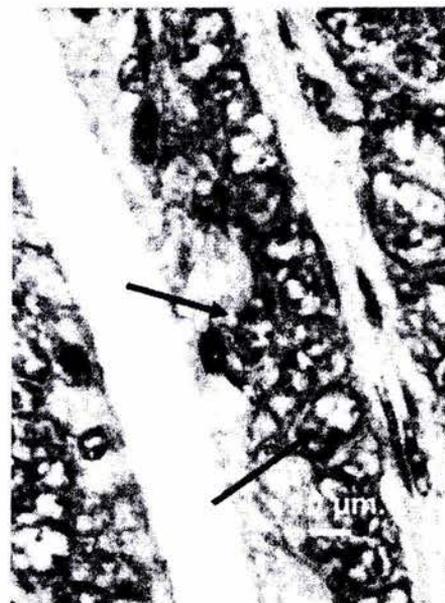


Figure 6. Mid-third of the midgut villi from a chicken fed 100% RFFS. Note the epithelial dysplasia with oval or round nuclei of variable sizes, dispersed and hyperchromatic chromatin (arrow), and an increase in the nucleus-to-cytoplasm ratio; hematoxylin and eosin; bar = 10 μm .

considered to be reversible, yet has sometimes been seen to be a precursor of neoplastic processes (33).

As the RFFS increased in the diet, the villi length decreased linearly ($P < 0.001$) in the duodenum, by 105.4 μm for each 20% of SBM substitution, as described by the equation $Y = 2064.35 - 5.27 S + 0.04 S^2$, where $R^2 = 0.0632$, whereas in the midintestine it decreased ($P < 0.001$) 53.2 μm , as described by the equation $Y = 1063.45 - 2.66 S$, where $R^2 = 0.2054$ (Table 4). Thus, villi atrophy of chickens increased with increasing SBA content in RFFS. Similar to other lectins and animal models, villi atrophy affected the digestive and absorptive processes, as reflected in the chemical characteristics of the feces, food intake, weight gain, and, thus, in feed conversion (4, 6–8).

Table 5. Total Pigment Intake (mg) Per Chick, Skin Area, Optical Density of Serum Xanthophylls, and Skin Pigmentation (CIE Lab Scale) at 42 Days^a

diets ^c	mean ± SE					
	pigment intake ^d	body area ^e	optical density of serum xanthophylls ^f	<i>L</i> ^g ± SE	skin pigmentation ^b <i>a</i> ^h ± SE	<i>b</i> ⁱ ± SE
0%	170 ± 4.51 ^a	153 ± 3.67 ^a	0.12 ± 0.029 ^{bc}	67 ± 0.96	10 ± 0.78	32 ± 2.13 ^c
20%	175 ± 1.45 ^a	150 ± 3.67 ^a	0.10 ± 0.029 ^c	69 ± 0.88	8 ± 0.71	39 ± 1.94 ^{ab}
40%	151 ± 3.51 ^{ab}	132 ± 3.67 ^b	0.18 ± 0.039 ^{abc}	68 ± 0.92	9 ± 0.74	35 ± 2.03 ^{bc}
60%	159 ± 8.45 ^{ab}	126 ± 3.67 ^b	0.16 ± 0.034 ^{bc}	69 ± 0.88	9 ± 0.71	42 ± 1.94 ^{bc}
80%	150 ± 6.11 ^{ab}	116 ± 3.67 ^{bc}	0.19 ± 0.031 ^{ab}	69 ± 0.88	8 ± 0.71	37 ± 1.94 ^{abc}
100%	127 ± 5.45 ^b	97 ± 3.67 ^c	0.27 ± 0.031 ^a	69 ± 0.92	7 ± 0.74	38 ± 2.03 ^{abc}
<i>P</i> ≤ <i>t</i>	**	**	**			

^a Superscript letters a–c: means in same column with different superscripts were significantly different. ^b Skin pigmentation evaluated from 10 chicks per treatment at 42 days, with a Minolta CR300 chromometer (CIE lab scale). ^c Experimental diets with increasing percentage of raw full fat soybean. ^d Total pigment intake per chick along the 21 days with finisher diet (mg). ^e Body area = $W^{0.67}$. ^f Serum xanthophylls concentration from six chicks per treatment, at day 42, liquid spectrophotometry with 480 nm absorbance. ^g Brightness. ^h Redness. ⁱ Yellowness. ^j Significance of effects: ***P* ≤ 0.01; **P* ≤ 0.05; without * corresponds to *P* ≥ 0.05. Values represent the means ± standard error of the mean.

Pigmentation. In the present study, increasing RFFS substitution in the diet increased xanthophylls absorption and decreased protein absorption that could have been caused by the pathological changes of epithelial intestine triggered by SBA binding and internalization. The xanthophyll serum concentration increased linearly (*P* < 0.01), as described by $Y = 0.1008 + 0.0013 S$, where $R^2 = 0.2666$, despite the linear reduction (*P* < 0.01) in feed intake and, thus, in total xanthophyll intake, as described by $Y = 27.85 + 5.6 S - 0.677 S^2$, where $R^2 = 0.0919$. This result suggests that the pigment absorption process became more efficient as RFFS inclusion in the diet increased (Table 5). This efficiency could be due to sufficient maturity of the hyperplastic cells during their migration to the tip of the villi with a consequent increase in absorptive surface area (8) and also to markedly enhanced absorption of lipids and bile acids between the duodenum and the upper jejunum with RFFS (34, 35), since xanthophylls are liposoluble compounds and their absorption is intimately associated to the digestion and absorption of fatty acids found in the diet (36, 37). Tyczkowski et al. (38) found that lutein, the most abundant pigmenter of Marigold petals, is absorbed mainly in the duodenum and jejunum. This increased absorption of pigment was reflected in the greater pigment deposition in the skin (*P* < 0.05) with increasing RFFS substitution that caused more yellowness. However, the linear increase in cutaneous yellowness was observed only with up to 60% RFFS substitution in place of DSM, whereas with greater levels of substitution the yellowness decreased, as described by the equation $Y = 27.85 + 5.6 S - 0.677 S^2$, where $R^2 = 0.0919$. This effect could be related to the increased fatty acid excretion (Table 3).

In the chemical analysis of the feces, the EE values, which correspond to fatty acid excretion, increased (*P* < 0.05) with increasing RFFS substitution, as described by the equation $Y = 116.75 + 0.53 S$, where $R^2 = 0.8111$, as observed in Table 3. These results concur with observations by Sklan et al. (34, 35) who showed that in spite of the fact that RFFS increases absorption of lipids and bile acids between the duodenum and the upper jejunum, it also reduces the rate of disappearance of residual amounts of these compounds in the ileum and colon increasing fecal excretion of fatty acids and bile acids. On the other hand, the increase in fatty acid excretion in rats fed with the lectin from *P. vulgaris* corresponded to triglycerides produced during the increased catabolism of lipids in the subcutaneous tissue (8). The skin pigmentation is related to the quantity of pigment deposited in subcutaneous adipose tissue. Perhaps, for this reason, the yellowness of skin values decreased when broilers were fed with 80–100% RFFS meal, which

contains more than 2747 μg/g, as compared to broilers fed with 60% RFFS (Table 5).

It is inferred that the damaging effects of SBA in the broiler intestine do not affect either absorption or xanthophyll deposition in the adipose tissue of the skin. On the basis of these observations it might be advisable to verify the SBA concentrations in commercial soybean meal used for broiler feed. Broilers seem to have specific glycoprotein receptors for SBA in the intestinal epithelium. When SBA adheres to the microvilli and penetrates into the cytoplasm of the enterocytes, in concentrations ranging from 884 to 2747 μg/g, there is epithelial hyperplasia and intestinal villi atrophy, but at concentrations greater than 3196 μg/g, the villi atrophy is severe and the epithelial cells that cover the villi are immature due to dysplasia. From these considerations, it is inferred that these lesions could be responsible for indigestion and malabsorption of nutrients and, as such, induce deficient weight gain similar to the events occurring during the RSS of broilers.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Tamas Fehervari for his fruitful discussion, Dr. José Antonio Quintana for advice and for providing the chicks, and M. S. M. V. Z. Daniel Atilano for his instructions to successfully carry out the Rocket immunoelectrophoresis. We also thank Dr. Raul Cortés Coronado of Industrial Orgánica, S.A.de C.V., Monterrey, Mexico, for technical assistance and for providing the xanthophyll.

LITERATURE CITED

- (1) Kouwenhoven, B.; Avellar, F. G.; Van Walsum, J. Infectious proventriculitis causing runting in broilers. *Avian Pathol.* **1978**, *7*, 183–187.
- (2) Reyes, R. A.; Barbosa, E.; Robles, V. M. T. Lectinas y su relación con tránsito rápido (Mala digestión). XVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, PANVET 98, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, 1998.
- (3) Songsem, Th.; Pol, J. M. A.; Van Roozelaar, D.; Kok, G. L.; Wagenaar, F.; Ter Huurne, A. A. H. M. A comparative study of pathogenesis of malabsorption syndrome in broilers. *Avian Dis.* **2000**, *44*, 556–567.
- (4) Sotelo, A.; González, L. A.; Gonzalez, G. M. T.; Velasco, E.; Feria, V. A. Ultrastructural changes of epithelial intestinal cells induced by the ingestion of raw *Phaseolus acutifolius*. *Nutr. Rep. Int.* **1983**, *27*, 865–873.

- (5) Banwell, J. G.; Howard, R. W.; Ceri, H.; Fang, K. Dose response effects of phytohemagglutinin lectin on rat small intestine. In *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*; Bog-Hansen, T. C., et al., Eds.; Sigma Chemical Co.: St. Louis, MO, 1987; Vol. 6, pp 133–136.
- (6) Calderón de la Barca, A. M.; Vázquez, M. L.; Valencia, M. E. The lectin of *Amarantus cruentus* resists in vivo proteolysis and affects the gastrointestinal mucosa of rats. In *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*; Bog-Hansen, T. C., et al., Eds.; Sigma Chemical Co.: St. Louis, MO, 1987; Vol. 6, pp 125–132.
- (7) Grant, G. Antinutritive effects of soyabean. A review. *Food Nutr. Sci.* **1989**, *13*, 317–348.
- (8) Puzsai, A. *Plant Lectins*; Cambridge University Press: Cambridge, 1991; pp 105–164.
- (9) Meanz, D.; Irish, G.; Classen, H. Carbohydrates-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1999**, *76*, 335–343.
- (10) de Oliveira, A. C.; de Campos Vidal, B.; Sgarbieri, V. C. Lesions of intestinal epithelium by ingestion of bean lectins in rats. *J. Nutr.* **1989**, *35*, 315–322.
- (11) Moran, E. T., Jr. Intestinal physiology influencing enteric diseases in fowl. Enteric disease control. *Proceedings of 39th Annual Meeting of the American Association of Avian Pathologists*; American Association of Avian Pathologists: Louisville, 1996; pp 11–16.
- (12) Sharma, R.; Fernandez, F.; Hinton, M.; Schumacher, U. The influence of diet on the mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cell Mol. Life Sci.* **1997**, *53*, 935–942.
- (13) Cuca, G. M.; Avila, G. E.; Pro, M. A., Eds. *Alimentación de las Aves*, 8th ed.; Chapingo; Universidad Autónoma de Chapingo: Estado de México, Mexico, 1996.
- (14) Carlos, B. F.; Carlos, F. *Nutrition III*, versión 3.0; Comercializadora de Software: Mexico, 1994.
- (15) Hayward, J. W. Determination and interpretation of test results of urease activity in soybean meal. Technical consultant. Minneapolis, Minneapolis 1975. In *Control de Calidad y Análisis de Alimentos para Animales*; Tejada, H. I., Ed.; Sistema de educación Continua en Producción Animal A. C.: Mexico, 1992; p 92.
- (16) AOAC. *Official Methods of Analysis*, 15th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington DC, Arlington, 1990.
- (17) Hudson, L.; Hay, F. C. *Practical Immunology*, 2nd ed.; Blackwell Scientific Publications: Oxford, London, 1989; pp 129–131.
- (18) Bielorai, R.; Iosif, B.; Neumark, H. Nitrogen absorption and endogenous nitrogen along the intestinal tract of chicks. *J. Nutr.* **1985**, *115*, 568–572.
- (19) Tejada, H. I. *Control de Calidad y Análisis de Alimentos para Animales*; Sistema de educación Continua en Producción Animal: Mexico, 1992; p 92.
- (20) Luna, L. G. *Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3rd ed.; American Registry of Pathology; McGraw-Hill: New York, 1968.
- (21) Allen, P. C.; Danforth, H. D.; Morris, V. C.; Levander, O. A. Association of lowered plasma carotenoids with protection against ceecal coccidiosis by diets high in n-3 fatty acids. *Poult. Sci.* **1996**, *75*, 966–972.
- (22) McDonald, P.; Eduardo, R. A.; Greenhalgh, J. F. A. *Animal Nutrition*, 2nd ed.; Oliver and Boyd: Edinburgh, 1973; p 264.
- (23) Monari, S. In *Full Fat Soya Handbook*; American Soybean Association, Eds.; Center International Rogier: Brussels, 1992.
- (24) Perilla, N. S.; Cruz, M. P.; de Belalcazar, F.; Diaz, G. J. Effect of temperature of wet extrusion on the nutritional value of full-fat soybean for broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* **1997**, *38*, 412–416.
- (25) Balloun, S. L. In *Soybean Meal in Poultry Nutrition*; Lepley, K. C., American Soybean Association, Ed.; Ovid Bell Press: Foulton, St. Louis, MO, 1980; pp 29–35.
- (26) Duke, G. E. Alimentary canal: Secretion and digestion, special digestive functions, and absorption. In *Avian Physiology*, 4th ed.; Sturkie, P. D., Eds.; Springer-Verlag: New York, 1986; pp 289–302.
- (27) Lepokvsky, S.; Furuta, F. Lipase in pancreas and intestinal contents of chickens fed heated and raw soybean diets. *Poult. Sci.* **1970**, *49*, 192.
- (28) Baintner, K. Fate of the antinutritive proteins of soybean in the ovine gut. *J. Vet. Med. A* **1993**, *40*, 427–431.
- (29) Douglas, M. W.; Parsons, C. M.; Hymowitz, T. Nutritional evaluation of lectin-free soybeans for poultry. *Poult. Sci.* **1999**, *78*, 91–95.
- (30) Coates, M. E.; Hewitt, D. A comparison of the effects of raw and heated soy-bean meal in diets for germ-free and conventional chicks. *Br. J. Nutr.* **1969**, *24*, 213–225.
- (31) Pattison, M. Problems of diarrhoea and wet litter in meat poultry. In *Recent Advances in Animal Nutrition*; Harsign, W., Cole, D. J. A., Eds.; University of Nottingham School of Agriculture: Great Britain, 1987; pp 320–330.
- (32) de Oliveira, A. C.; Sgarbieri, V. C. Effect of diets containing dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) on the rat excretion of endogenous nitrogen. *J. Nutr.* **1986**, *116*, 2387–2392.
- (33) Jones, T. C.; Hunt, R. D. *Veterinary Pathology*, 5th ed.; Lea and Febiger: Philadelphia, 1983; pp 109–110.
- (34) Leeson, S.; Summers, J. D. *Nutrition of the Chicken*, 4th ed.; University Books: Guelph, Ontario, Canada, 2001; p 66.
- (35) Krogdahl, A. Digestion and absorption of lipids in poultry. *J. Nutr.* **1985**, *115*, 675–685.
- (36) Sklan, D.; Budowski, P.; Ascarelli, I.; Hurwitz, S. Lipid absorption and secretion in the chick: effect of raw soybean meal. *J. Nutr.* **1973**, *103*, 1299–1305.
- (37) Sklan, D.; Hurwitz, S.; Budowski, P.; Ascarelli, I. Fat digestion and absorption in chicks fed raw or heated soybean meal. *J. Nutr.* **1975**, *105*, 57–63.
- (38) Tyczkowski, J. K.; Hamilton, P. B. Evidence for differential absorption of zeacarotene, cryptoxanthin and lutein in young broiler chickens. *Poult. Sci.* **1986**, *65*, 1137–1140.

Received for review November 17, 2003. Revised manuscript received June 2, 2004. Accepted June 2, 2004. This research was supported by the "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN216398)".