



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**Estudio de la integridad de la barrera epitelial en aves de engorda
expuestas a una dosis moderada de aflatoxina B1 y desafiadas
con Salmonella enterica Serovar Enteritidis**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias de la Producción y Salud Animal

PRESENTA:

JUAN OMAR HERNÁNDEZ RAMÍREZ

TUTOR

JESUS ABRAHAM MENDEZ ALBORES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
ARKANSAS UNIVERSITY

RUBEN MERINO GUZMAN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. MEX. AGOSTO 2022



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.

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1.0 INTRODUCCIÓN	3
1.1 La Industria avícola en México.....	3
1.2 Historia de las micotoxinas	5
1.2.1. Generalidades de las micotoxinas	6
1.3. Las aflatoxinas.....	7
1.3.1. Biosíntesis de las aflatoxinas.....	8
1.3.2. Unión de la aflatoxina al ADN dando origen a la formación de aductos.....	11
1.3.3 Efectos biológicos de las aflatoxinas	11
1.3.4. Efectos sobre las aves de engorda.....	12
1.3.4.1 Signos clínicos de la aflatoxicosis.....	12
1.3.4.2. Hematología y química sanguínea	13
1.3.4.3. Aflatoxinas y la respuesta inmune	14
1.3.4.4. Efectos sobre la producción de anticuerpos	14
1.3.4.5. Efectos sobre sustancias humorales no específicas	15
1.3.4.6. Efectos sobre la respuesta inmune mediada por células.....	15
1.3.4.7. Alteración de la resistencia a procesos infecciosos específicos.....	15
1.3.4.8. Diagnóstico de aflatoxicosis.....	15
1.4. Problemática de la salud avícola	16
1.5. Enfermedades bacterianas.....	17
1.5.1 <i>Salmonella</i>	17
1.5.2. Salmonelosis	19
1.5.3. Adhesión bacteriana por <i>Salmonella</i>	20
1.5.4. Translocación bacteriana de <i>Salmonella</i>	21
1.5.5. Signología de Salmonelosis en las aves.....	21
1.6. El tracto gastrointestinal.....	22
1.6.1 Principales micotoxinas que causan daño al tracto gastrointestinal.....	22
1.6.2. Las aflatoxinas en el tracto gastrointestinal.....	23
1.7. El rol de la microbiota intestinal en la permeabilidad intestinal	24
1.7.1. El efecto negativo de las micotoxinas en la absorción intestinal.....	25
1.7.2. Efectos de las micotoxinas sobre la función de barrera intestinal	27
1.8. Moléculas de adhesión en las uniones estrechas	29

1.8.1. Interacción de la barrera intestinal y las proteínas de unión.....	29
1.8.2. Proteínas de unión estrecha	29
1.8.2.1. Claudinas	31
1.8.2.2. Ocludinas	32
1.8.2.3. Zonula Occludens.....	33
1.8.2.4. Moléculas de unión adherente – JAM.....	33
1.8.2.5. Uniones comunicantes (GAP)	35
1.8.2.6. Desmosomas	35
1.8.2.7. Hemidesmosomas adherentes.....	36
1.10. Intestino permeable	37
2.0 JUSTIFICACIÓN	39
3.0 HIPÓTESIS	40
4.0 OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo general	40
4.2 Objetivos particulares	40
5.0 MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1. Material biológico	42
5.3. Dieta contaminada con aflatoxinas	44
5.3.1 Producción de las aflatoxinas	44
5.4. Determinación de las aflatoxinas.....	45
5.5. Mezcla del alimento con las aflatoxinas	46
5.6. Reproducción de la cepa de <i>Salmonella enterica</i> Serovar Enteritidis.....	47
5.7. Manejo zootécnico	48
5.8. Registro de las variables.....	48
5.9. Técnica de necropsia	49
5.10. Toma de muestras	49
5.13. Cuantificación de IgA.....	50
5.14. Isotiocianato de fluoresceína-dextran (FITC-D) como biomarcador de la permeabilidad intestinal	50
5.15 Análisis estadístico.....	50
6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
6.1 Índices productivos	52
6.1.1 Ganancia diaria de peso.....	52
6.1.2 Índice de conversión alimenticia.....	53

6.1.3 Tasa de mortandad	54
6.2 Bioquímica sanguínea	55
6.3 IgA total intestinal	56
6.4 Peso de órganos de las aves	57
6.5 Hallazgos macroscópicos y microscópicos	59
6.6 Histología Hematoxilina & eosina	61
6.7 Histología con tinción de Gram	61
6.8 Permeabilidad de FITC-D	64
7.0 CONCLUSIONES	67
7.1 Conclusión general	67
7.2 Conclusiones particulares	68
7.2.1 Parámetros productivos	68
7.2.2 Bioquímica sanguínea	68
7.2.3 Peso de órganos.....	68
7.2.4 Histología (Hematoxilina & Eosina)	68
7.2.5 Histología (Gram).....	69
7.2.6 FITC-D.....	69
7.2.7 IgA Intestinal	69
8.0 PERSPECTIVAS.....	69
9.0 REFERENCIAS.....	70
10.0 APÉNDICE.....	79

Resumen

Las micotoxinas constituyen uno de los principales problemas en el ramo avícola, la aflatoxina B₁ (AFB₁), además de causar efectos negativos en el organismo, puede lesionar el tejido epitelial intestinal permitiendo la translocación de bacterias. El presente trabajo demuestra la acción negativa de la AFB₁, sobre las proteínas de unión estrecha y cómo éstas a su vez, interactúan con *Salmonella enterica* Serovar *enteritidis* en el pollo de engorda. Para este propósito, se utilizaron 200 pollos Ross 308, machos de 1 día de edad, los cuales se dividieron aleatoriamente en 4 tratamientos de 5 réplicas cada uno (10 aves por réplica), y se alimentaron *ad libitum* durante 21d con los siguientes tratamientos: **CT**, (AFB₁, Libre de aflatoxinas, *S. enteritidis*, Libre de UFC), **AFLA**, (AFB₁ 470 ng/g, *S. enteritidis*, libre de UFC); **SAL**, (AFB₁, Libre de aflatoxinas, *S. enteritidis*, 10⁸ UFC al día 18 de edad); y **AFLA + SAL**, (AFB₁, 470 ng/g, *S. enteritidis*, 10⁸ UFC al día 18 de edad). En el día 21 de edad, las aves recibieron una dosis oral de isotiocianato de fluoresceína-dextran (FITC-D) para evaluar la permeabilidad intestinal. Se tomaron muestras de sangre para evaluar el perfil bioquímico, y de intestino para evaluar la secreción de IgA total. Se muestreó asépticamente el tejido hepático, renal y bolsa de Fabricio para su evaluación histológica con las técnicas de Gram y H&E. Los resultados mostraron que las aves que recibieron AFB₁ presentaron disminución de los parámetros productivos, un incremento significativo en la concentración de FITC-D en el suero sanguíneo, así como lesiones asociadas a la toxicidad provocada por AFB₁ en el tejido renal, hepático y bolsa de Fabricio ($p < 0.05$). Sin embargo, la infección por *S. enteritidis* no tuvo un efecto adicional en la permeabilidad intestinal. Estos resultados indican que una dosis de 470 ng AFB₁/g impacta negativamente la función de la barrera intestinal en pollos de engorda a los 21 días de edad.

Palabras clave: Aves, Aflatoxina B₁, *Salmonella enterica*, Permeabilidad intestinal.

Abstract

Mycotoxins are one of the main problems in the poultry industry; aflatoxin B₁ (AFB₁), in addition to causing negative effects on the body birds, this toxin can damage the intestinal epithelial tissue allowing the translocation of bacteria. This work demonstrates the negative action of AFB₁ on tight junction proteins and how these, in turn, interact with *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in broilers. For this purpose, 200 Ross 308 1-day-old male chicks were used, which were randomly divided into four treatments of 5 replicates each (10 / replicate), and were fed *ad libitum* for 21d with the following treatments: CT, (AFB₁, Aflatoxin without addiction, *S. enteritidis*, CFU without addiction); AF, (AFB₁ 470 ng/g, *S. enteritidis*, CFU without addiction); SAL, (AFB₁, without addiction of aflatoxins, *S. enteritidis*, 108 CFU at day 18 of age); and AFLA + SAL, (AFB₁, 470 ng/g, *S. enteritidis*, 108 CFU at day 18 of age). On day 21 of age, birds received an oral dose of fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-D) to assess intestinal permeability. Blood samples were taken to evaluate the biochemical profile, and intestine samples to evaluate total IgA secretion. Liver, kidney, and cloacal bursa tissue were aseptically sampled for histological evaluation with Gram and H&E techniques. The results showed that the birds that received AFB₁ presented a decrease in the productive parameters, a significant increase in the concentration of FITC-D in the blood serum, and lesions associated with the toxicity caused by AFB₁ in the renal tissue, hepatic, and cloacal bursa ($p < 0.05$). However, *S. Enteritidis* infection did not have an additional effect on intestinal permeability. These results suggest that a dose of 470 ng AFB₁/g negatively impacts intestinal barrier function in broilers at 21 days of age.

Keywords: Broiler, Aflatoxin B₁, *Salmonella enterica*, Leaky gut.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 La Industria avícola en México

En el entorno actual de México, las actividades pecuarias, al igual que las industriales son un factor socioeconómico de gran importancia; bajo esta premisa, la industria alimentaria en sus diferentes áreas, se ha convertido en la punta de flecha para el sostenimiento de la macroeconomía. Se menciona que, hoy, estas áreas económicas deben ser un ejemplo de sostenibilidad, éstas a su vez apoyadas por diferentes sectores como el sector agrícola que le proveen todo lo necesario en materia prima para la regulación de esta importante función económica. Dentro de los principales contaminantes del alimento se encuentran los microorganismos fúngicos y bacterianos que merman la calidad del grano y que convergen en diferentes problemas como son la toxicidad del alimento y posteriormente, como consecuencia, la formación de patologías entéricas. Se conoce el efecto tóxico de algunos metabolitos fúngicos como son las aflatoxinas y especies procariontas como las bacterias (*Salmonella*, *E. coli*), éstas pueden tener un efecto sinérgico dentro del huésped, acelerando los procesos de enfermedad, lo que puede ocasionar la muerte, con repercusiones económicas de importancia productiva. La ganadería, específicamente en lo referente al consumo de carne se encuentra catalogada como una de las actividades productivas con mayor auge en la última década y proyecciones económicas de interés para 2022. Por otra parte, la avicultura es una de las industrias que ha tenido una evolución importante a lo largo de esta última década, proporcionando proteína de origen animal de bajo costo (SAGARPA 2011).

El pollo tiene diversos ciclos de producción al año. En 2017 fueron sacrificados 3 millones 200 mil toneladas de aves y se proyecta que en 2022 sean aproximadamente 3 millones 950 mil toneladas de aves. Además, derivado de los cambios en la dieta de los consumidores y de los precios relativos del pollo en comparación con los de la carne de cerdo y la de bovino, se espera que el consumo *per cápita* de pollo se incremente de 30 Kg en 2011 a alrededor de 32.5 Kg en 2022. Lo antes mencionado es derivado del incremento en la demanda, además de que es la cadena pecuaria que mayor eficiencia presenta al convertir grano en carne. Es importante resaltar que todo esto no se llevaría a cabo sin los insumos necesarios para el mantenimiento de esta importante industria, ya que dentro de ésta se encuentran: en un porcentaje menor los costos variables y mantenimiento que son alrededor del 30%, por lo tanto, la alimentación de los animales representa hasta un 70% del total de los costos de producción en una explotación, lo que convierte a este último en un objetivo importante que garantice la ganancia de

peso, conversión alimenticia y al final, una mayor eficiencia en la canal; todo esto, al menor costo posible (SADER-SIAP 2020).

La producción de carne en México se sustenta en diferentes ramas de la ganadería, dentro de las cuales sobresalen la bovina, la porcina y la avícola, que en conjunto aportan el 98% de la producción doméstica de productos cárnicos, el resto de las actividades destinadas a la producción de carne, como son la producción ovina, caprina, la de conejos y la de pavos, entre otros, mantienen una posición restringida e influenciada por los hábitos de consumo de la población y que son diferentes a lo largo del territorio nacional.

Bajo el actual entorno económico se puede mencionar que, la avicultura se encuentra en primer lugar a nivel nacional en la producción de productos cárnicos, y en un segundo lugar, se encuentra el huevo para plato el cual otorga hasta este momento la proteína de origen animal más barata del mercado nacional. Por lo anteriormente señalado, la avicultura, se ha convertido en la proteína de origen animal más consumida en nuestro país. Para este 2022, el consumo de carne de pollo se proyecta que será de un 48.30 % del total del consumo del país, datos mencionados por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER-SIAP 2020).

A lo largo de la historia se ha observado que los bloques de productos cárnicos de las diferentes especies han mostrado periodos estáticos, haciendo que los gráficos de producción no se vean modificados. Sin embargo, la carne de bovino en 1990 obtenía el 41.0% del consumo total del país ocupando el primer lugar de consumo. Para 2012 se encontraba con un 31.0% siendo desplazada a un segundo término y para 2020 ocupa un 28.0% del total de carnes consumidas en el país. El pollo, por su parte, tiene un consumo creciente que en 2020 llegó a 48.14%, considerado desde hace algunos años ya un mercado creciente. Hoy día con los análisis de mercado se ha pronosticado que la tendencia hacia el crecimiento de la producción avícola evidentemente es atractivo para varios sectores de nuestro país y dado esto se convierte en una industria próspera y consolidada (SAGARPA 2011).

Al igual que en otras ramas de la producción ganadera, el aumento de los volúmenes de producción avícola lleva al crecimiento de consumo de alimentos balanceados. Los granos forrajeros, pastas y/o granos oleaginosos conforman parte fundamental de las dietas usadas para obtener los mayores niveles de productividad, aprovechando para ello el potencial productivo de las aves de engorda.

La SAGARPA estimó para el censo de 2016 la demanda de granos forrajeros por la industria de carne de ave (sin tomar en cuenta el pavo), la cual fue de 3,088 millones de toneladas, 1,288 toneladas por arriba de los consumidos por el sistema

pecuario de bovinos. Es importante resaltar que, este consumo aparente refleja la necesidad de un mercado competitivo Porcentualmente, casi el 58.29% de los granos forrajeros se destina al consumo avícola, hoy se estima que el consumo de esta industria es de 9,323 toneladas (SADER-SIAP 2021). Los granos en el alimento como se mencionó anteriormente son imprescindibles para la elaboración de concentrados proteicos balanceados y debido a que son productos perecederos, es importante tener en cuenta las condiciones que mantienen estos durante su cosecha, transporte y almacenamiento ya que deben conservar características organolépticas y nutritivas para así tener un mejor rendimiento de los alimentos. Se conoce el hecho de que un mal manejo en el almacén o transporte de los granos favorece el crecimiento de hongos microscópicos los cuales tienen la capacidad de producir algún tipo de micotoxina; además de provocar la putrefacción y cambiar drásticamente la calidad de los granos (Alassane-Kpembi, Schatzmayr et al. 2017).

1.2 Historia de las micotoxinas

El conocimiento de la existencia de las enfermedades en el hombre y en los animales, asociadas al crecimiento de hongos en los alimentos, data de siglos atrás. Tal es el caso del “ergotismo” enfermedad asociada al consumo de alimentos contaminados con el cornezuelo del centeno, llamado por los Asirios “Pústula nociva en la espiga del centeno” que provocaba que la embarazada abortara y muriera en el parto. En la Edad Media aparecieron por primera vez descripciones del envenenamiento por el cornezuelo; se registraron epidemias cuyo síntoma característico era gangrena de pies, piernas, manos y brazos, se decía que las personas eran consumidas por “el fuego sagrado” se ennegrecían como el carbón, por lo que la enfermedad se denominó “fuego sagrado o fuego de San Antonio”, en honor al beato en cuyo santuario se buscaba la curación. Es probable que el alivio encontrado al viajar al santuario fuera real, pues los peregrinos no consumían centeno contaminado durante el viaje. En 1815 fue posible determinar la naturaleza fúngica del parásito del cornezuelo del centeno y en 1875 se identificaron los componentes tóxicos del hongo *Claviceps purpurea*, como responsables del ergotismo (Motta 2009).

En 1934 en Illinois, Estados Unidos, murieron 5,000 caballos al consumir maíz contaminado con hongos. Para 1939 se aislaron dos toxinas del hongo *Aspergillus fumigatus* una hemolítica y otra pirógena. En 1940 el distrito de Orenburg (antes URSS), hoy Rusia, se vio afectado por una epidemia de aleukia (leucopenia) tóxica alimentaria. Esta enfermedad disminuye los glóbulos blancos además de disminuir la resistencia a las enfermedades, debido al consumo de mijo contaminado con

“tricotecenos”. Como consecuencia, la enfermedad produjo numerosas muertes, llegando hasta el 10% en algunas poblaciones.

Fue hasta 1962 cuando una serie de circunstancias hizo cambiar la actitud adoptada frente a los hongos en los alimentos destinados para el consumo humano y/o animal: la aparición de una enfermedad en los pavos en Inglaterra, que llevó a la muerte a 100,000 pavos denominada la “enfermedad X” (Turkey X disease). La investigación permitió concluir que la causa de la muerte de las aves era una sustancia producida por el hongo *Aspergillus flavus*. Al poco tiempo hubo brotes similares que afectaron a otras aves de corral. El origen de la enfermedad se encontró en apelmazados de prensado de cacahuates mezclado en el alimento, con rapidez sorprendente se detectó el hongo responsable, el *Aspergillus flavus* y también fueron aislados sus metabolitos tóxicos, las aflatoxinas (acrónimo de *Aspergillus flavus toxin*). A partir de 1961, con el aislamiento de las aflatoxinas producidas por el *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, se evidenció la importancia de los hongos saprófitos en el desarrollo de procesos patológicos en animales y la posible conexión con la patología humana (Estrada Salazar and Ramírez Galeano 2019).

A raíz de las observaciones anteriores, tanto la medicina humana como la medicina veterinaria han dado cada vez más importancia a las micotoxinas, sobre todo después de saber que incluso contenidos muy pequeños de éstas pueden comprometer no sólo la salud humana, sino también la salud de los animales, causando grandes pérdidas económicas. Por lo anterior, se ha fomentado la búsqueda sistemática de las micotoxinas en los diferentes nichos alimenticios; como resultado de estos estudios llevados a cabo durante 50 años, hoy se conocen más de 400 toxinas y 350 hongos que tienen la capacidad de producirlas, sus preferencias por los diversos sustratos, su composición, su estructura química y las diferentes especies de hongos que las producen (Brase, Encinas et al. 2009, Estrada Salazar and Ramírez Galeano 2019).

1.2.1. Generalidades de las micotoxinas

La palabra micotoxina proviene de la raíz griega *Mico* = hongo y *Toxina* = veneno. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por ciertos hongos y en pequeños contenidos pueden ser tóxicos a los animales que las ingieren, y consecuentemente al hombre. Las evidencias actuales que se tienen sobre la importancia de los diferentes hongos toxígenos que crecen en granos indican que los géneros más importantes son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, y se ha encontrado que estos tres géneros comprendían el 58% de 943 cepas de hongos, a los que les probaron su toxicidad (Cervantes and Cuevas 1996).

La presencia de micotoxinas en los productos alimenticios depende de cepas específicas de hongos y estas cepas están sujetas a la influencia de factores ambientales como la humedad y la temperatura. Por lo tanto, la contaminación micotóxica de los productos alimenticios puede variar según las condiciones geográficas, climáticas, métodos de producción, tipos de almacenamiento y el tipo de alimento. Algunos productos alimenticios son sustratos más aptos que otros para el crecimiento de los hongos y la producción de toxinas. Dentro de las micotoxinas más importantes están las aflatoxinas, ochratoxina A, deoxinivalenol, fumonisinas y zearalenona, por mencionar algunas (Mionetto Cabrera 2017).

1.3. Las aflatoxinas

Las aflatoxinas como metabolitos secundarios son las toxinas más estudiadas y son producidas por algunas cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Se han descrito hasta hoy 18 tipos distintos de aflatoxinas, las más comunes son las aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂, y M₁, M₂); estas toxinas, se pueden encontrar en productos tales como la soya, el maíz, los cacahuates y otros granos, además de frutos secos y semillas oleaginosas y subproductos. Pero las aflatoxinas también pueden llegar al consumo humano a través de productos animales; las vacas, al ingerir productos contaminados con aflatoxinas, metabolizan las aflatoxinas B₁ y B₂ a aflatoxinas M₁ y M₂, que se excretan en la leche (Herrero Querol, Lorán Ayala et al. 2012). Además de ser un potente carcinógeno y estar clasificado en el Grupo I por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC), es importante resaltar que esta clasificación a diferencia de algunos otros agentes de la clasificación del grupo I, no ha recibido modificaciones desde 1971 (Humans and Cancer 2002).

En los animales de producción, las aflatoxinas producen una disminución en la tasa crecimiento, disminuyen la eficiencia alimentaria, deprimen la respuesta inmunológica y eventualmente, en los cuadros crónicos, se relacionan con síndrome paraneoplásico y cáncer, los cuales incluyen: vómito, edema pulmonar, alteración de las enzimas hepáticas, además de esto dependiendo de la dosificación y de la frecuencia pueden llegar a causar la muerte (Maygua and Humberto 2012).

1.3.1. Biosíntesis de las aflatoxinas

Existen dos series o tipos de aflatoxinas, la serie G y la serie B, las cuales difieren químicamente ya que la serie G presenta un anillo de lactona, en cambio la serie B presenta un anillo de ciclopentenona, además las series AFG₁ y AFB₁ presentan una doble ligadura en el carbono 8-9 en lugar de una unión vinil éter, pero no así en la serie B₂ y G₂. En el caso específico de *Aspergillus flavus* muy rara vez sintetiza G₁, G₂ o bien se ha reconocido que los niveles de expresión de éstas son bajos; sin embargo, el mecanismo por el cual no lo hace todavía se encuentra bajo estudio (Carvajal 2013). También existen sub-metabolitos como el Q₁, P₁ y aflatoxicol, éstos pueden estar presentes, ya sea en hígado o en la orina de muchos mamíferos incluyendo al hombre. Para que las aflatoxinas puedan causar daño es necesario que se encuentren algunas características como son: contenido, tiempo de dosificación y susceptibilidad de la especie (Wright, Greene-McDowelle et al. 2000).

En la avicultura, el contacto de los hongos y sus toxinas con el alimento es una constante debido a las dietas que se ofrecen a los animales, ~~debido~~ ya que éstas son formuladas en base a granos, los cuales pueden tener cierto contenido de toxina, además, de que el factor tiempo en la presentación del agente contaminantes dentro de los granos es de suma importancia. Una vez que las toxinas entran en contacto con el organismo, al igual que los fármacos, se distribuyen de igual forma en el organismo para llevar a cabo dos procesos importantes para el organismo:

- 1.- Farmacocinética; la cual abarca desde la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un agente y que éste a su vez, tendrá que bio-transformarse además de excretarse.

- 2.- Farmacodinamia; el agente a su paso por el organismo desemboca en mecanismos de acción de un fármaco o toxina, incluyendo la acción y cambios bioquímicos a nivel celular, así como el efecto de éstas y sus consecuencias en los órganos blanco.

Aspergillus es uno de los principales hongos contaminantes de los granos y éstos son el principal sustento del sector pecuario y considerando que en un ciclo productivo las aves pueden ingerir grandes cantidades de grano y éstos a su vez contener grandes contenidos de toxina, existen tres vías de entrada al organismo

que repercutirán de diferente forma en el organismo animal, dado que, es un hecho que la vía de entrada primaria al organismo es por vía digestiva. La absorción de la aflatoxina en el lumen puede ser total o parcial, y esto depende de la especie animal que esté involucrada, aunque se sabe que a nivel intestinal la absorción es por difusión pasiva y dependiente de la composición lipídica del epitelio intestinal. Posteriormente, llega al torrente sanguíneo y de ahí parte hacia los diferentes órganos blanco y depósitos de grasa, pero, el mayor acúmulo ocurre en los órganos involucrados con la biotransformación y eliminación de los desechos alimenticios como son hígado y riñón (Sumano López and Ocampo Camberos 2006). En segundo lugar, se encuentra el pulmón, seguido por la piel dado que las aflatoxinas son compuestos liposolubles y por esta característica es más fácil su absorción.

Una vez que la aflatoxina se encuentra en torrente circulatorio se aloja principalmente en el hígado y por medio del complejo enzimático citocromo P450 así como el citocromo 488, se activa una vía de biotransformación en compuestos de índole hidrosoluble, por medio de una hidroxilación en otros metabolitos secundarios llamados M₁, Q₁, aflatoxicol (Ro) y por medio de una O-dimetilación en otros sub-metabolitos como lo es P₁. Todos estos sub-metabolitos se han descrito que son de menor toxicidad que la AFB₁.

Otra de las vías de transformación de la aflatoxina es por medio de una epoxidación de la toxina, el sub-metabolito resultante es un epóxido conocido como aflatoxina 8-9 epóxido, el cual tiene una alta afinidad al ADN celular, esta unión da la formación de un compuesto denominado aducto (complejo entre la molécula de ADN y un compuesto químico ajeno a la estructura polinucleotídica de la doble hélice, a través de un enlace covalente, causando distorsiones genéticas), que en las aflatoxinas será 8-9 dihidro-8-(N⁷-guanina)-9 hidroxí-AFB₁ (AFB₁-N⁷-Gua) el cual va a modificar la secuencia del ADN celular con lo que da origen a mutaciones y problemas asociados al cáncer (Santos Chona 1999). En la **Figura 1**, se pueden observar las vías de biotransformación de la aflatoxina.

Un sub-metabolito igual de importante es el aflatoxicol (Ro), este compuesto es 18 veces menos inofensivo que la AFB₁, no se origina a partir de enzimas microsomales ya que depende de enzimas del citoplasma celular. Si este compuesto sufre una oxidación por medio de deshidrogenasas, revierte su estructura a AFB₁, dado este proceso se considera como un reservorio de AFB₁ y éste puede ser la antesala de la enfermedad cancerígena llevado a largo tiempo (Gimeno and Martins 2000).

La presencia de aductos de AFB₁ unidos a albúmina en sangre, es indicativo de que la toxina fue metabolizada hasta epóxido ya sea en el lumen del intestino, en el enterocito o bien en el torrente sanguíneo y su presencia es usada como

biomarcador de exposición a AFB₁. Desde el punto de vista bioquímico, las aflatoxinas son consideradas como inhibidores biosintéticos y en el caso de la AFB₁ se ha encontrado que su actividad biológica tiene varias fases como las que se describen a continuación (Alvarez Bañuelos, Carvajal Moreno et al. 2000).

1. Interacción con el ADN e inhibición de las polimerasas responsables de la síntesis tanto de ADN como de ARN.
2. Supresión de la síntesis de ADN.
3. Reducción de la síntesis de ARN e inhibición del ARN mensajero.
4. Alteraciones en la morfología del nucléolo.
5. Reducción de la síntesis de proteínas.

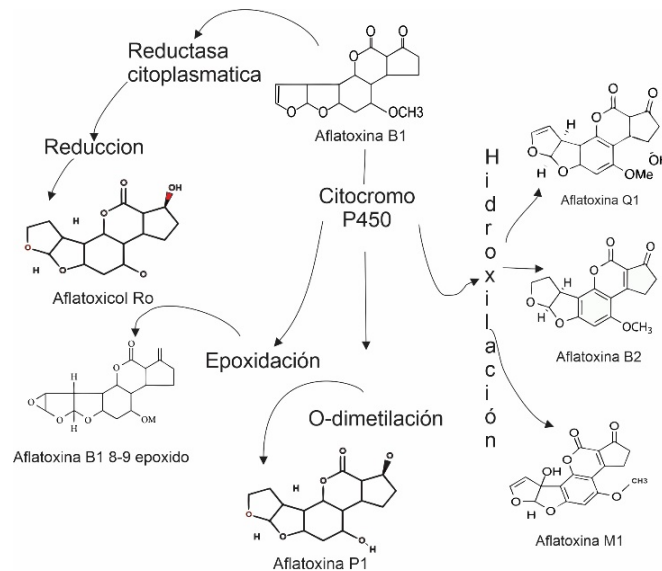


Figura 1. Vías de biotransformación de AFB₁

(tomada de Hernandez R.J.O., 2021)

1.3.2. Unión de la aflatoxina al ADN dando origen a la formación de aductos.

La AFB₁ está entre los más potentes carcinógenos conocidos para algunas especies animales y el hombre. La capacidad de la AFB₁ para producir mutaciones se conoce por la habilidad de un metabolito activado para unirse covalentemente a la guanina del ADN en la posición N-7 (aducto) y esta reacción podría ser importante en el inicio del cáncer. Estudios epidemiológicos realizados en Asia y África han asociado la incidencia de cáncer primario del hígado con el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas (Wang and Groopman 1999).

1.3.3 Efectos biológicos de las aflatoxinas

Uno de los principales efectos de las aflatoxinas es la toxicidad a diferentes órganos, uno de los más involucrados es el hígado. Dependiendo de la duración de la exposición y del contenido de la toxina, puede presentarse toxicidad aguda o bien crónica; ejemplo de esto, es la exposición crónica con niveles bajos de aflatoxinas, en este caso, es muy probable que ésta ocurra con mayor facilidad que una exposición aguda debido a los contenidos que por lo regular llegan a ser entre 100 – 500 µg/Kg para una toxicidad crónica o bien de 1 mg/Kg o más en exposiciones agudas. En la literatura, existen evidencias de que una exposición crónica a AFB₁ en animales de experimentación, puede producir desde cáncer hepático hasta cirrosis. Un efecto celular importante que se ha descrito es la citotoxicidad *in vitro* en la cual se han comprobado los efectos producidos por las aflatoxinas. Muchos de estos hallazgos se han estudiado en líneas celulares como células embrionarias de diferentes especies incluido el hombre. También está demostrado que la AFB₁ puede afectar de forma importante la mitosis de algunas células, especialmente hepatocitos dada su alta velocidad de mitótica (Alassane-Kpembé, Schatzmayr et al. 2017).

Existen diversos efectos provocados por las aflatoxinas siendo uno de los más importantes la inmunosupresión, ya que debilita la respuesta del sistema inmune celular y humoral, provocando un aumento en la susceptibilidad de los animales hacia enfermedades de diferente naturaleza. Además, pueden existir efectos inmunológicos sin observarse patologías clínicas aparentes.

La carcinogenicidad es otro efecto de las aflatoxinas, se conoce que el desarrollo de cáncer se puede dividir en las etapas de iniciación, promoción y progresión. y que pueden terminar en muerte del intoxicado. Por otra parte, las lesiones preneoplásicas y los tumores malignos en humanos están caracterizados por la

expresión de cambios enzimáticos, análogos a los observados en modelos animales, los cuales llegan a presentar tumores en:

- Colon
- Estómago
- Intestino delgado
- Esófago
- Cavidad oral
- Hígado
- Tejidos pulmonares
- Glándula mamaria

La capacidad de las aflatoxinas para inducir tumores en especies animales difiere considerablemente, siendo uno de los principales motivos la variabilidad en cuanto al metabolismo, distribución y excreción en el organismo intoxicado; de la misma forma, las cantidades mínimas necesarias para la inducción de cáncer son también dependientes de estas propiedades, sin perder de vista, la susceptibilidad relativa de cada especie animal. Existen efectos teratógenos de la AFB₁, principalmente prenatales, sobre ciertos animales. Puesto que es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas en células eucariotas, altera la diferenciación celular y con esto desemboca en problemas variados en las diferentes etapas de gestación, desde la formación del producto hasta la posibilidad de aborto, del mismo modo en las aves, las repercusiones también son de índole reproductivo desde la formación del huevo hasta la posible muerte del embrión (Alvarez Bañuelos, Carvajal Moreno et al. 2000, Quezada, Cuellar et al. 2000, Barnes, Zubair et al. 2018).

1.3.4. Efectos sobre las aves de engorda

1.3.4.1 Signos clínicos de la aflatoxicosis

Cuando se trata de intoxicación aguda, generalmente la presentación de la enfermedad es de forma repentina, incluso ésta puede llegar a la muerte; al contrario de una intoxicación crónica, en donde se pueden observar aves pálidas

con pobre pigmentación, pérdida de peso, retardo del crecimiento, aumento de la tasa de mortandad, disminución en la conversión alimenticia, e inmunodepresión, además de la adición de infecciones bacterianas y parasitarias secundarias. En el caso de las aves de postura, existe disminución del porcentaje de huevos por ciclo, fragilidad del cascarón, huevo en fáfara, huevo manchado, todos estos son signos que reflejan el estatus general del ave (Andretta, Kipper et al. 2012).

Existen diversas lesiones morfológicas que presentan las aves que consumen alimento contaminado con aflatoxinas; uno de los órganos que sufre deterioro es el hígado, éste, macroscópicamente se observa con tonalidades blanco grisáceo a amarillo verdoso, al pasar el tiempo desarrolla focos blanquecinos bien delimitados, existen petequias o equimosis, incluso éstas pueden llegar a ser hematomas extensos. Se ha reportado atrofia hepática o hipertrofia dependiendo el tiempo de exposición y dosis, además de que en algunos casos coexisten con focos de necrosis extensiva. Por otra parte, bajo observaciones microscópicas se puede observar hepatosis grasa, hiperplasia de conductos biliares, fibrosis perilobulillar, focos de necrosis coagulativa, perihepatitis linfoide, hemorragia y congestión multifocal (Díaz 2019).

Al riñón, macroscópicamente, se le observan tonalidades blanco-amarillentas difusas y, microscópicamente, muestra necrosis tubular de tipo coagulativo, degeneración grasa, infiltración linfoide la cual puede verse acompañada de calcificación distrófica. Órganos linfoides como lo es el bazo, bolsa cloacal y timo macroscópicamente son de menor tamaño y con tonalidades blanquecinas. Microscópicamente presentan atrofia de bolsa cloacal, timo y bazo con atrofia linfoide. Otras lesiones descritas son: cardiomegalia, discondroplasia tibial, atrofia de médula ósea, observándose de color blanquecino y hemorragias en masas musculares (petequias y equimosis). La actividad de los leucocitos y la respuesta inmune también se ven afectadas por la presencia de aflatoxinas, el efecto negativo sobre las proteínas del complemento, la producción de interferón, la disminución de proteínas séricas y baja actividad leucocitaria son presumiblemente resultado de la lesión hepática y de la inhibición de la síntesis de proteínas (De Oliveira, Souto et al. 2018).

1.3.4.2. Hematología y química sanguínea

A nivel sanguíneo la AFB₁ presenta un anillo dicumárinico similar al que presenta la vitamina K, por lo que actúa suplantándola y mimetizándola, ocasionando hemorragias y descenso del hematocrito. Se han encontrado porcentajes de hematocrito por debajo del 25% en animales contaminados con esta toxina. Adicionalmente, se menciona que la concentración de proteína sérica, así como el colesterol disminuyen notablemente. Los niveles de colesterol, calcio, fósforo, así

como la actividad enzimática de la aspartato-aminotransferasa (AST) y alanino-aminotransferasa (ALT) se ven notablemente afectados (Andretta, Kipper et al. 2012).

1.3.4.3. Aflatoxinas y la respuesta inmune

La AFB₁ tiene los efectos biológicos más potentes dentro de las micotoxinas, su principal mecanismo de acción a nivel celular es la capacidad de unirse al ADN y al ARN celular afectando directa o indirectamente la proliferación y diferenciación continua de las células del sistema linfóide y la síntesis proteica de las células. También afecta la producción de polipéptidos como monocinas, interleucinas y factores del complemento que regulan el sistema inmune y también la síntesis de anticuerpos. Ciertas clases de inmunoglobulinas (IgG e IgA) parecen ser más afectadas que otras. Los factores séricos y celulares necesarios para una fagocitosis óptima son afectados deteriorando la locomoción espontánea y quimiotáctica de los heterófilos aviares y disminución del conteo de linfocitos T periféricos al igual que la función fagocítica y disminución de la respuesta inmune mediada por macrófagos, específicamente de los fagocitos en el sistema retículo endotelial.

En algunos casos se producen efectos histopatológicos significativos y atrofia de los principales órganos del sistema inmune. Las aflatoxinas pueden llegar hasta el embrión comprometiendo el sistema inmune de la progenie, haciéndolos más susceptibles a varios patógenos y una respuesta deficiente a los programas de vacunación, es decir, menores títulos de anticuerpos post-vacunales (Pestka and Bondy 1994, Bondy and Pestka 2000, Oswald, Marin et al. 2005).

1.3.4.4. Efectos sobre la producción de anticuerpos

Los análisis de inmunoglobulinas revelaron un impacto de las aflatoxinas sobre el nivel de IgG e IgA, aunque los niveles de IgM generalmente no se afectaron. En animales que consumieron alimento contaminado con aflatoxinas se disminuyó la formación de anticuerpos contra la inoculación de eritrocitos de oveja de manera experimental. Adicionalmente, se ha reportado una reducción en los títulos de anticuerpos frente a la enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa y enfermedad de la bolsa de Fabricio en gallinas ponedoras alimentadas con 200 µg AFB₁/Kg (Bondy and Pestka 2000).

1.3.4.5. Efectos sobre sustancias humorales no específicas

Dentro de las acciones importantes de la AFB₁ se encuentra la supresión del cuarto componente del complemento (C4), el cual es necesario para la activación de la vía clásica del sistema del complemento, complejo de ataque a la membrana por actividad hemolítica, lisis bacteriana, etc. Esta disminución parece ser el resultado del efecto de las aflatoxinas sobre las funciones del hígado, así como también sobre la función del macrófago que es el responsable de la liberación de quimiotácticos que activan al complemento (C4) (Chang, Horn et al. 2005).

1.3.4.6. Efectos sobre la respuesta inmune mediada por células

La AFB₁ ejerce parte de sus actividades inmunosupresoras a través de la supresión cuantitativa de la producción de linfocinas por parte de las células T. Además, pueden causar linfocitopenia disminuyendo la concentración de linfocitos T, en la aflatoxicosis, la leucopenia se explica como la consecuencia de la disminución de los estímulos para la leucopoyesis (Perozo Marín, Ferrer et al. 2003, Tessari, Oliveira et al. 2006).

1.3.4.7. Alteración de la resistencia a procesos infecciosos específicos

Los efectos del consumo de aflatoxinas sobre la resistencia a infecciones son altamente variables dependiendo de los procesos infecciosos específicos involucrados, la susceptibilidad del hospedante a las aflatoxinas y su interacción. La resistencia a pasterelosis en la avicultura es definitivamente afectada por las aflatoxinas. Aumentan la susceptibilidad o la gravedad de la coccidiosis cecal y de la enfermedad de Marek, de Salmonelosis, y al virus de la Bursitis infecciosa, etc. En algunos ensayos se demostró que dosis de aflatoxinas de 500 µg/Kg disminuyó la presencia de IL2, lo que generó una disminución a la respuesta por la vacunación de las enfermedades de Newcastle y Gumboro (Giambrone, Diener et al. 1985, Kulanthaivel, Srinivasan et al. 2012, Jahanian, Mahdavi et al. 2019).

1.3.4.8. Diagnóstico de aflatoxicosis

El diagnóstico etiológico ha sido evolutivo desde que se reportaron los primeros casos de toxicidad asociada a alimentación. En la actualidad, la precisión en los resultados es determinante para predecir patologías de pronta atención. Se puede

llegar al diagnóstico por medio de una historia clínica bien realizada y apoyándose en los signos clínicos de los animales, además de pruebas de laboratorio de gabinete como: necropsia e histopatología, adicionalmente se deben hacer pruebas de posible toxicidad en el alimento utilizando algunas de las técnicas citadas en la **Tabla 1**. (Lin, Zhang et al. 1998, Otta, Papp et al. 2000, Tanaka, Yoneda et al. 2000).

Tabla 1. Técnicas diagnósticas utilizadas para la determinación de niveles de toxicidad por aflatoxinas

Métodos	Métodos aprobados por la Secretaría de Salud México
<i>Cromatografía de líquidos (LC)</i>	Aprobado
<i>Cromatografía en capa fina (TLC)</i>	No aprobado
<i>Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)</i>	No aprobado
<i>Cromatografía de gases (GC)</i>	No aprobado
<i>Columnas de inmutaafinidad (Análisis inmunoenzimáticos como Aflatest®)</i>	Aprobado
<i>Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)</i>	No aprobado

(Salud-N.O.M. 2000)

1.4. Problemática de la salud avícola

La avicultura moderna no está exenta de factores causantes de desequilibrios en la granja, los cuales pueden ser de índole clínico o zootécnico. La alta densidad de población, errores en la vacunación, las altas o bajas temperaturas, humedad alta, el aumento de gases tóxicos como el amoniaco, la alta carga de microorganismos patógenos, así como la inmunosupresión, son algunas de las problemáticas causantes de niveles altos de estrés en las aves. Estas situaciones traen consigo la aparición frecuente de diversas enfermedades y la disminución de los niveles de producción de las aves ya sea de engorda o de postura (Lamus 2013).

Es importante saber que las aves de engorda sufren enfermedades de tipo bacteriano, viral, fúngico y/o parasitario, y que cualquiera de ellas, individualmente o en conjunto, pueden causar un desequilibrio en el organismo repercutiendo de manera negativa en los parámetros productivos desde el primer día de edad hasta el término del ciclo productivo. En el caso de las enfermedades producidas por bacterias, en su mayoría, causan infecciones intestinales e intervienen con la adecuada salud intestinal y, por consiguiente, afectan el desarrollo de la parvada. Esta afección inicia con la adhesión del microorganismo a las células del hospedero, de esta forma evitan el desalojo de los microorganismos por mecanismos fisiológicos. Al adherirse, se permite un mejor acceso a los nutrientes, facilita la liberación de toxinas en el huésped y, eventualmente, la penetración de estos a diferentes tejidos (Houriet 2007, Rondón, Samaniego et al. 2008).

1.5. Enfermedades bacterianas

Para que una bacteria se desarrolle en el hospedero, es necesaria la localización en un ambiente adecuado para su replicación. Los pasos que se presentan en el proceso de infección bacteriana son: adhesión, invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa y daño al huésped. Una vez que la bacteria se encuentra dentro del organismo, experimenta severos cambios ambientales ejemplo de ello: el pH, cambios extremos de temperatura, la tensión de oxígeno y la osmolaridad; por lo que el microorganismo responde a estos cambios modulando la expresión de sus genes (Marquez, Escorcía et al. 2019).

Cuando se habla de bacterias, el género entérico *Salmonella* es uno de los principales microorganismos capaz de causar enfermedad gastrointestinal, lo cual le da mayor importancia en la salud animal debido al impacto económico que ocasiona. Igualmente, este género ha sido responsable de importantes problemas de salud pública en todo el mundo. La Salmonelosis es una enfermedad de curso agudo, distribución mundial y responsable de grandes pérdidas económicas en la industria avícola (Rodríguez Hernández 2015).

1.5.1 *Salmonella*

Esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, phylum Proteobacteria. Es un bacilo gram negativo que no forma esporas, anaerobio facultativo, estrechamente relacionado morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, mide de 2 a 4 μm de largo por 0.6 μm de ancho. En la **Figura 2**, se muestra la taxonomía de *Salmonella* y se evidencia la cepa utilizada en esta tesis.

Figura 2. Clasificación taxonómica de Salmonella

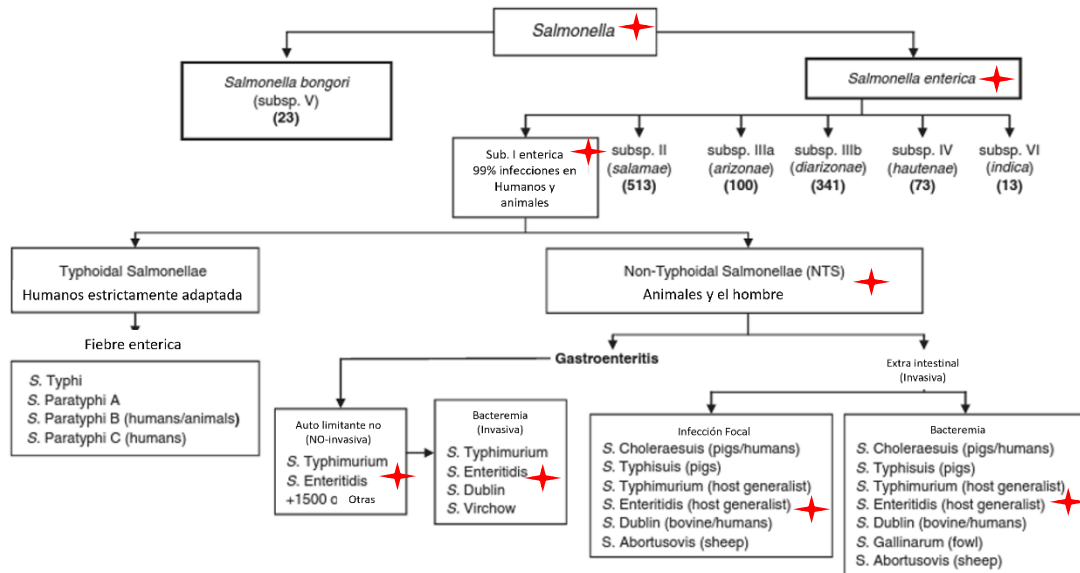


Figura 3. Clasificación taxonómica de Salmonella (modificada de (Sanderson and Nair 2013).

Esta bacteria es móvil debido a la presencia de flagelos peritricos, a excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum* (Herrera and Jabib 2015). Para fines de diagnóstico y epidemiología, la nomenclatura se basa en los nombres de los serotipos de la subespecie, por ejemplo, *Salmonella entérica*, subespecie *entericae*, serotipo *enteritidis*, se abrevia como *Salmonella enteritidis* (Castillo, Martínez et al. 2008). Según la clasificación de Kauffmann-White, *Salmonella enteritidis* pertenece al grupo D, subgrupo 1 con antígenos O: 1, 9, 12 y H, G, M; lo cual le permite a este serotipo afectar a todas las especies animales, incluido el humano. Desde 1980 se produjo un aumento mundial de casos de infecciones por *Salmonella enteritidis*, lo cual produjo incremento de infecciones en el humano y en aves, derivando en pérdidas económicas en la industria avícola. Mientras que la mayoría de los estudios sobre la patogénesis de *Salmonella sp.* se enfocaron en *S. typhimurium*, la patogénesis de *S. Enteritidis* ha sido muy poco investigada, a pesar de que en los últimos años ésta última ha superado a *S. typhimurium* como el serotipo más común en la industria avícola (Ruiz Flores, Constantino Casas et al. 2008, Estrada, Hernández et al. 2010, Stojanović-Radić, Pejčić et al. 2018).

1.5.2. Salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad causada por *Salmonella sp.* que se ha tornado muy importante en la investigación avícola ya que se trata de una de las principales enfermedades que causa problemas en el sistema digestivo de las aves y, por consiguiente, pérdidas económicas en las producciones de engorda y postura. Su transmisión es por la vía oral y después de su ingestión a través de agua y alimento contaminado, se inicia su ciclo de infección invadiendo al hospedero a través de las placas de Peyer y tonsilas cecales (Shivaprasad, Timoney et al. 1990, Craven, Stern et al. 2000).

Cuando *Salmonella* llega a la mucosa intestinal y después a la submucosa es fagocitada por macrófagos, estos mueren vía caspasa 1 y la bacteria queda libre, después, se disemina en el torrente sanguíneo, entrando directamente a los vasos sanguíneos para llegar a otros órganos como el hígado. Una vez en sangre, es reconocida como una bacteria extracelular. Induce la migración de heterófilos y macrófagos (PMN), y la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL8, IFN γ y TNF α . El incremento de la permeabilidad vascular que acompaña la inflamación en combinación con la pérdida de la integridad epitelial de la mucosa intestinal provoca la diarrea, al verse incrementada la salida de líquidos y electrolitos al lumen intestinal. En el epitelio intestinal se localizan conglomerados de células del sistema inmunológico llamadas células M. Éstas, al tener contacto directo con los antígenos bacterianos, provocan la secreción de anticuerpos en el lumen intestinal, predominantemente inmunoglobulinas A. Consecuentemente, de la activación de la IgA, las bacterias destruyen a las células M dando lugar a la ruptura de la arquitectura intestinal (aumento de la permeabilidad) permitiendo que *Salmonella* pueda infectar a los enterocitos adyacentes (Van Immerseel, De Buck et al. 2003, Quiroga Ardiles 2009).

Otro mecanismo por el cual *Salmonella* puede alcanzar la submucosa intestinal es a través de las células dendríticas, las cuales emiten prolongaciones entre las uniones celulares de los enterocitos, permitiéndole llegar a torrente sanguíneo y diseminarse a sitios distantes para ocasionar infección sistémica. La colonización del hospedero requiere una adaptación genética de *Salmonella*, misma que se ubica en una parte específica del cromosoma bacteriano denominada isla de patogenicidad (IPS). Aunque existen más de 14 diferentes IPS, la presencia de cada una de ellas varía dependiendo de la serovariedad de *Salmonella*; sin embargo, cinco de ellas son comunes en el cromosoma de todas las serovariedades. La IPS-1 codifica proteínas involucradas en la translocación de las moléculas efectoras y sus chaperonas (proteínas que ayudan al despliegue de otras proteínas) dentro del citoplasma de la célula hospedera; la IPS-2 regula la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de fagocitos y células epiteliales; la IPS-3 se requiere para la supervivencia intracelular en macrófagos, provee productos esenciales para el crecimiento en

condiciones limitadas de Mg^{2+} ; la IPS-4 media la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular en los macrófagos; la IPS-5 codifica proteínas efectoras involucradas en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal; además de estimular la secreción de cloro, se encuentra involucrada en el flujo de macrófagos (Rajabi, Jones et al. 2011, Silva and López 2012). Así mismo, *Salmonella* logró desarrollar dos sistemas de interacción con el hospedero llamados sistemas de secreción tipo III (SST3) configurados por las IPS-1 y 2. Su principal función no es la de secretar proteínas al medio extracelular, sino la translocación de éstas desde el citosol bacteriano hasta el interior de las células del hospedero. De esta manera se realizan cambios en el enterocito modificando así sus rutas de transducción y re-arreglos en el citoesqueleto por un mecanismo conocido como disparo (Trigger). La bacteria envía señales a las células epiteliales que inducen la formación de ondulamiento (Ruffling) en su superficie y así *Salmonella* penetra al citosol del enterocito dentro de una vacuola, la cual le servirá para poder replicarse. Después del periodo de adaptación, *Salmonella* se replica dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas (VCS), que se caracterizan por tener concentraciones limitadas de Mg^{2+} y Fe^{2+} , y un pH ácido, por lo tanto, la acidificación dentro del fagosoma es necesaria para la supervivencia y replicación intracelular (Hüttener Queiroz 2012, García Pastor 2017).

1.5.3. Adhesión bacteriana por *Salmonella*

Las lectinas son proteínas de origen no inmune que tienen especificidad por residuos de carbohidratos, monosacáridos, glucoproteínas o glucolípidos terminales o subterminales, con los que forman uniones no covalentes selectivas y reversibles, característica que les confiere la propiedad de reconocer, aglutinar células o precipitar gluco-conjugados. En el caso de *Salmonella*, se adhiere al enterocito por medio de su lectina fimbrial tipo 1 relacionada con el carbohidrato de manosa específicamente ubicado sobre la superficie del enterocito. La mayoría de las lectinas de superficie (adhesinas o factores de colonización) parecen reconocer oligosacáridos complejos de la superficie de las células eucarióticas. En el caso de *Salmonella*, sus lectinas son específicas a la D-manosa. El hecho notable es que la lectina bacteriana se une a los tres primeros azúcares ligados con el lípido ceramida, ubicado en la membrana celular y no con los azúcares terminales. Es decir que la lectina bacteriana está preparada para reconocer secuencias cortas internas que pueden ser mostradas por el gluco-esfingolípido insertado en la membrana de la célula huésped. En la actualidad, algunas investigaciones revelan que el gluco-esfingolípido (GSL) GlcCer (N-1) y el gangliósido GM3 (G-1) de la mucosa intestinal de los pollos, presentes en el intestino delgado, ciego y recto, son los receptores de la fimbria SEF21 específica de *S. enteritidis* (Micucci and Camps 1987, Cajachagua Pucuhuaranga 2018).

1.5.4. Translocación bacteriana de *Salmonella*

Después de que *Salmonella* se fija al enterocito por medio de su lectina, invade enterocitos vecinos y destruye células M, quedando un espacio de entrada en la pared intestinal para que la bacteria llegue libremente a la lámina propia, después al torrente sanguíneo y por último a otros órganos como el hígado. Al paso de *Salmonella* desde el intestino hacia el torrente sanguíneo y posteriormente, a otros órganos se le conoce como translocación bacteriana. Se necesitan tres tipos de mecanismos básicos para que se produzca la translocación bacteriana. En primer lugar, la alteración del equilibrio ecológico bacteriano de la flora intestinal, en concreto el sobrecrecimiento de *Salmonella*. En segundo lugar, la disfunción de los mecanismos de defensa inmunológica del huésped. Por último, la alteración en la barrera intestinal, con el consiguiente incremento en la permeabilidad intestinal favoreciendo el paso de las bacterias. El sobrecrecimiento bacteriano intestinal desempeña un papel muy importante en la patogenia de la translocación bacteriana y está favorecido por diversos factores como son; las alteraciones en los mecanismos de defensa inmunológica locales, disminución en la motilidad intestinal, mal manejo de la parvada, administración prolongada de antibióticos o problemas comunes como lo es la malnutrición.

1.5.5. Signología de Salmonelosis en las aves

Dentro de las evidencias de la presencia de la infección por la bacteria está la repentina baja en el consumo de alimento, la depresión en general de la parvada, presencia de plumaje erizado, aparición de diarrea verde-amarillenta y la elevada mortalidad en animales jóvenes y adultos y presencia de las lesiones más importantes; además, se presentan alteraciones de los órganos principales dentro de los cuales están: hígado congestionado y agrandado, a menudo con múltiples focos necróticos blanquecinos. En casos crónicos, el hígado presenta estrías en su superficie, bazo y riñones se observan congestionados y agrandados, el ovario se observa con congestión, focos equimóticos y con ruptura de ovocitos que degeneran en una peritonitis caseosa extensiva. Por otra parte, los intestinos se tornan congestionados y en ocasiones con focos necróticos. Estudios han demostrado que *Salmonella* sp. interacciona de forma negativa con las uniones estrechas del epitelio intestinal, provocando que éste sea altamente permeable (Awad, Hess et al. 2017).

1.6. El tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal (TGI) es el principal órgano responsable de la digestión de los alimentos, así como la absorción de energía y nutrientes; además, elimina los productos de desecho y es uno de los más importantes órganos de respuesta inmune dada la vasta variedad de su microbiota (Celi, Cowieson et al. 2017). El TGI funciona como una compuerta, siendo la mucosa la principal capa celular, la cual es la encargada de regular el paso continuo del microambiente en el que interactúan, las células y toda la microbiota como levaduras, bacterias, virus, parásitos, toxinas y proteínas (Wang, Zuidema et al. 2020).

La mucosa es una capa de vital importancia para la función impermeable del TGI, las células epiteliales son enterocitos endocrinos y funcionan entre las células caliciformes, las células de Paneth, las células M y conforman las vellosidades (Fink and Koo 2016). Por lo tanto, actúa como una barrera para bloquear la entrada de agentes nocivos como patógenos, toxinas y antígenos extraños. También, es un sitio importante para la absorción de nutrientes, incluidos electrolitos, nutrientes y agua, a través de su membrana permeable selectiva y de las uniones intercelulares. Los enterocitos regulan las complejas funciones antes mencionadas ya que se encuentran conectadas a través de una serie de formaciones proteicas como; las uniones adherentes, desmosomas y las uniones estrechas (TJP). Las uniones adherentes y los desmosomas son responsables de un enlace mecánico de las células y sus adyacentes, junto con estas, las TJP regulan el espacio intercelular y son responsables del transporte selectivo de solutos iónicos a través de la vía paracelular (Capaldo, Farkas et al. 2014). Por lo tanto, cualquier tipo de agente que modifique el microambiente del intestino tiene la capacidad de alterar la homeostasis, ejemplo de esto son las aflatoxinas, ya que éstas generan eventos negativos como el aumento de la permeabilidad intestinal (Hernandez-Ramirez, Nava-Ramirez et al. 2019).

1.6.1 Principales micotoxinas que causan daño al tracto gastrointestinal

Los principales efectos de la contaminación de alimentos se concentran en el tracto gastrointestinal, considerado como el primer sistema en sufrir daño causado por las micotoxinas. Se han contemplado en múltiples ensayos la asociación de efectos negativos desde el punto de vista nutricional y orgánico ocasionado por las diferentes micotoxinas sobresaliendo los tricotecenos, la zearalenona, las ochratoxinas, las fumonisinas y una de las más importantes por su alto grado de toxicidad, las aflatoxinas. Adicionalmente, con los antecedentes antes

mencionados, la posibilidad de encontrar más de una toxina en un mismo alimento es alta. Es por ello por lo que el conocer cada una de las principales toxinas y la interacción que guardan en el entorno digestivo es primordial para comprender las consecuencias en la salud intestinal.

1.6.2. Las aflatoxinas en el tracto gastrointestinal

La aflatoxina se produce como parte del metabolismo secundario de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *A. nomius*. Junto con las fumonisinas, es la micotoxina más común encontrada en los granos y cereales utilizados en la alimentación de humanos y animales. Existen diferentes toxinas como parte de la excreción de *Aspergillus*, siendo la principal la aflatoxina B₁ (AFB₁) y coexiste con B₂, G₁ y G₂. Esta toxina es conocida por ser el metabolito más tóxico sintetizada por un hongo además de ser un potente carcinógeno y está clasificado en el Grupo I por la IARC (Ostry, Malir et al. 2017). Cuando se acumula en el hígado de los mamíferos, la AFB₁ desarrolla carcinoma de células hepáticas, desencadenando en dolor abdominal y complicaciones sistémicas, además de que en todas las ocasiones ya sea agudo o crónico se conducen a un síndrome paraneoplásico, el cual incluye: vómito, edema pulmonar, alteración de las enzimas hepáticas, cambios en los niveles de células circulatorias y al final la muerte (Mohd-Redzwan, Jamaluddin et al. 2013). El complejo enzimático P450 en el hígado metaboliza a la AFB₁ en AFB₁-8,9-exo-epóxido, los exo-epóxidos son altamente reactivos y forman derivados con el ADN, el ARN y las proteínas, que posteriormente reaccionan con el gen supresor de tumores p53. La reacción genera AFB₁-N7-Gua que luego se convierte en su forma estabilizada, aducto de AFB₁-formamidopirimidina (AFB₁-FABY). AFB₁-FABY provocando la transversión de guanina (G) a timina (T), lo que conduce a una mutación y transformación. Adicionalmente, una arginina sufre una mutación a serina en el codón 249 y se produce un gen supresor p53 mutado con lo que se bloquea su función supresora y contribuyendo a la aparición de hepatocarcinogenesis (Kew 2013). Los efectos adversos incluyen inmunosupresión, genotoxicidad, anemia vascular, necrosis renal y alteración intestinal. La AFB₁ está comprometida estrechamente con la salud del tracto gastrointestinal. Experimentos en células Caco-2 determinaron que la AFB₁ promueve la toxicidad en el intestino, inhibe el crecimiento epitelial y el daño de la membrana celular, además de causar cambios en el ADN. También se encontró que el ensayo de resistencia eléctrica transepitelial mostró una reducción de la integridad de las células intestinales Caco-2 después del tratamiento con AFB₁ (Zhang, Zheng et al. 2015, Romero, Ares et al. 2016). Otros estudios revelaron que con la relación lactulosa-ramnosa (L:R) en el plasma en modelos de

pollos de engorda y usando AFB₁ se afectaron las funciones de la barrera intestinal, los resultados sugieren que a dosis de 1,5 mg de AFB₁/Kg en la dieta, altera significativamente el crecimiento, las principales medidas bioquímicas del suero, la digestibilidad de la energía y los aminoácidos, además se demostró que bajo el modelo propuesto se tiene un incremento de la absorción de la relación L:R provocado por la toxina (Chen, Naehrer et al. 2016). Se han realizado ensayos en donde se aumentó la exposición de AFB₁ en el alimento de pollos de engorda provocando efectos como reducción del tamaño intestinal (peso y longitud). Lo anterior conlleva a que biomarcadores apoptóticos caspasa-3 eleven su expresión (Hosseini, Gürbüş et al. , Peng, Zhang et al. 2014). Por otra parte, en un ensayo realizado se utilizó isotiocianato de fluoresceína dextran (FITC-D) en pollos de engorda, de maneja comparativa entre el grupo Control y el grupo AFB₁ se demostró que existe evidencia del aumento de la permeabilidad intestinal asociado con la toxicidad. Además, se demostró la formación lesiones más evidentes en el tejido hepático. También se reveló un importante efecto negativo en la bioquímica sanguínea (Hernandez-Ramirez, Nava-Ramirez et al. 2019). En contraste, el ensayo realizado en pollos de engorda con diferentes concentraciones de AFB₁ (2, 1.5, y 1 ppm), se observó una reducción significativa en la traslocación bacteriana y la integridad de la barrera epitelial intestinal no se vio comprometida después de la exposición a AFB₁ ($P > 0.05$) (Galarza-Seeber, Latorre et al. 2016).

1.7. El rol de la microbiota intestinal en la permeabilidad intestinal

El complejo de la microbiota intestinal está representado por bacterias, virus, hongos, parásitos y toxinas, que combinan elementos para convivir en el organismo bajo relaciones de simbiosis, mutualismo y así sobrevivir. Hace algunos años, la microbiota se explicaba como un solo elemento y las patogenicidades alrededor de las infecciones bacterianas se enfocaban en un solo género y especie. Por otra parte, la coexistencia del organismo patógeno y no patógeno no era entendible ni demostrable. Sin embargo, la microbiota intestinal se ha convertido en los últimos años en un área de investigación creciente por sus múltiples conexiones e interacciones entre la simbiosis o la infección (Holmes, Van Itallie et al. 2006, Hoffmann, Dollive et al. 2013). En el estudio de la metagenómica en la evolución de la detección y/o identificación de proteínas específicas del ADN en los diferentes microorganismos, ha permitido encontrar una colección de familias y cómo éstas interactúan en el intestino no patológico o llamado “sano”, con esta base de datos se busca promover nuevos métodos para el entendimiento de la microbiota (Kuczynski, Lauber et al. 2011).

Los avances en biología molecular han proporcionado formas innovadoras de desmarañar las complejas comunidades microbianas. Así mismo, usando los más novedosos métodos se ha revelado que la mayoría de los microorganismos que residen en el intestino no se pueden cultivar fuera del hospedero. En el caso del ser humano, aproximadamente 80% de las especies bacterianas totales en el intestino no se cultivaron en condiciones de laboratorio (Guarner and Malagelada 2003). Desde 1948 se han publicado más de 1300 estudios sobre la microbiota de las aves de corral, influenciados principalmente por los estudios sobre dietas y cómo funcionan las bacterias como probióticos o antibióticos. La composición de la microbiota podría afectar o no a la salud del hospedero o cambiar la aptitud del huésped. Es importante mencionar que la teoría del hologenoma sostiene que el organismo evoluciona junto con sus microbiomas (conjunto de genes de los organismos microscópico) y con la plasticidad fenotípica, además del desempeño reproductivo de los huéspedes cuando están estresados debido a factores ambientales (Rosenberg and Zilber-Rosenberg 2019). Las aves silvestres siguen siendo poco estudiadas a pesar de su relevancia para la transmisión de patógenos y resultan un enigma en la comprensión de la dieta y las influencias ambientales en la estructura y función microbiana intestinal. En suma, la composición de la microbiota intestinal podría afectar positivamente la aptitud del hospedador a través de su participación en la salud. La interacción entre la microbiota intestinal y el huésped es cercana. Adicionalmente, forman parte de la salud de todo el cuerpo animal o humano. Sin embargo, la conducción de estos modelos de investigación se adapta a humanos e incluso a los ovíparos, y en un menor grado a aves de producción (Morgavi, Rathahao-Paris et al. 2015, Huseyin, O'Toole et al. 2017, Mirzaei and Maurice 2017).

1.7.1. El efecto negativo de las micotoxinas en la absorción intestinal

La absorción intestinal es fundamental para que un organismo pueda funcionar, ya que dicha compuerta al medio externo genera grandes efectos negativos cuando se encuentran presentes agentes que cambian su homeostasis. Algunos autores han demostrado que la presencia de niveles moderados de AFB₁ presentan la capacidad de cambiar la absorción del isotiocianato de fluoresceína-dextran (FITC-D) mostrando resultados significativos, en el artículo se hace referencia, a que el aumento en suero fue de hasta 2.4 veces mayor comparativamente con el tratamiento Control (Hernandez-Ramirez, Nava-Ramirez et al. 2019). Otros autores hacen mención del deterioro intestinal ocasionado por AFB₁ demostrando la afección al tejido intestinal la cual provoca pérdida de conexión intercelular de las TJP Tejada-Castañeda et al., 2008, realizaron un desafío en pollos de engorda

Ross 308 de tres semanas, demostrando que las microvellosidades se vieron afectadas haciéndose poco evidentes bajo técnicas de microscopia por la dieta contaminada con AFB₁. Adicionalmente, la microscopia electrónica de barrido mostró que las microvellosidades eran más cortas e intercaladas, la línea de observación de TJP desapareció por completo, se observaron proteínas desnaturalizadas además de observarse masas irregulares. En consecuencia, a nivel del tracto gastrointestinal, se generó pérdida de adherencia epitelial favoreciendo así el daño a la barrera intestinal (Tejada-Castaneda, Avila-Gonzalez et al. 2008). Chen, Naehrer et al., en 2016, determinaron el impacto de AFB₁ (1500 ng/g) en la salud intestinal, desafiando a pollos de engorda con una técnica de doble azúcar (lactulosa:ramnosa) los resultados mostraron que en 20 días de tratamiento se aumentó la relación comparativamente con el tratamiento Control, lo que condujo a una disrupción de la barrera intestinal. Conjuntamente, la integridad del epitelio intestinal sufrió alteración observable en las TJP como consecuencia de la citotoxicidad y con ello el aumento en la translocación bacteriana, como son *Salmonella*, *E. coli*. Esta información se complementa, ya que se ha relacionado una mayor disfunción celular en la absorción intestinal, principalmente cuando las condiciones del hospedero se asocian a esteatosis hepática, lesión que es muy compatible con la intoxicación por AFB₁ (Sergent, Parys et al. 2006, Gratz, Wu et al. 2007, Ilan 2012, Burel, Tanguy et al. 2013). Por otra parte, otros ensayos con micotoxinas señalan que concentraciones moderadas de fumonisinas afectaron el equilibrio de la microbiota digestiva y que en caso de coinfección con *Salmonella* aumentaron la microbiota 48 horas después de la inoculación, lo que dejó como resultado el efecto aditivo de la agresión al tejido intestinal provocado por esta toxina (Burel, Tanguy et al. 2013). Acompañado de avances en diferentes tecnologías de metaanálisis, como genómica, proteómica y metabolómica, se pueden evaluar los efectos de la exposición a ciertas micotoxinas sobre la salud intestinal ya que estos avances están generando nuevas formas de valoración y entendimiento bajo esta evolución tecnológica se pretende generar nuevos horizontes para el entendimiento del microbioma intestinal (Liu, Yan et al. 2013).

Se tienen suficientes informes de las consecuencias del consumo de alimento contaminado con micotoxinas, tales como AFB₁, ZEA, DON, FB₁ y patulina, además se tiene registro de cómo funcionan estas toxinas como agentes primarios. Adicionalmente, se ha demostrado cómo algunos microorganismos o sus metabolitos microbianos actúan como agentes concomitantes acelerando el proceso de ingreso a los tejidos ya sea por translocación o bien por invasión. Sin embargo, también se ha hecho mención acerca de que algunos microorganismos pueden biológicamente degradar micotoxinas como lo es el caso de *Flavobacterium aurantiacum*, *Nocardia asteroides*, y *Corynebacterium rubrum*,

estas cepas interactúan con AFB₁ mostrando reducción en la presencia de la misma (Wu, Jezkova et al. 2009, Upadhaya, Song et al. 2012). En algunos medios de cultivo como lo es agar Sabouraud, se ha demostrado que algunas especies como *Aspergillus niger*, *Eurotium herbariorum*, y *Rhizopus spp.* no son considerados tóxicos, pero al ser sometidos a cambios en el microambiente, éstos llegan a biotransformar al aflatoxicol hacia AFB₁. Alternativamente se ha reportado que *Tetrahymena pyriformis* tiene la habilidad de bio-transformar AFB₁ a aflatoxicol (R0) en un 25% durante 30 h. y AFG₁ en 80% durante 10 h. Lo que significa que entre especies del mismo reino existe competencia de sobrevivencia (Robertson, Teunisson et al. 1970, Wu, Jezkova et al. 2009).

En diferentes artículos se ha escrito el tema de la microbiota intestinal, y que en ésta se establecen diversos agentes que pueden llegar a degradar micotoxinas ya sea parcial o total; no obstante, algunas de las pruebas aplicadas, demuestran un aumento en la formación de residuos resultantes de la degradación celular, bajo el catabolismo de toxinas como es el caso del DON. Finalmente, en el catabolismo resultante de las proteínas de oclusión es posible encontrarlo como parte de los residuos resultantes, facilitando que sean utilizados como biomarcadores celulares tras la destrucción de tejido dejado por diferentes condiciones ya sean físicas, químicas o biológicas. Bajo este esquema, el rastreo biológico ha sido de gran importancia para poder así comprender el entorno intestinal (Pinton, Nougayrede et al. 2009, Yunus, Ghareeb et al. 2012, Ghareeb, Awad et al. 2015, Pinton, Graziani et al. 2015).

En resumen, las micotoxinas pueden dañar la función de la barrera intestinal, incluidas las proteínas de oclusión y algunas secreciones paracelulares como los péptidos. Por tanto, los tejidos asociados con la luz intestinal responden a las micotoxinas mediante una mayor permeabilidad intestinal y la degradación de la función de barrera de la mucosa intestinal a través de diferentes vías (Springler, Hessenberger et al. 2016, Du, Wang et al. 2017, Springler, Hessenberger et al. 2017)

1.7.2. Efectos de las micotoxinas sobre la función de barrera intestinal

Los efectos de las micotoxinas se han reportado en diferentes especies productivas: vacas lecheras, pollos de engorda y porcinos (Grenier and Applegate 2013). Los estudios tratan de conocer la inmunotoxicidad, hepato- y nefrotoxicidad; sin embargo, se sabe poco sobre el mecanismo por el cual las micotoxinas intoxican el tracto gastrointestinal (Marin, Motiu et al. 2015). La barrera intestinal es la primera línea defensiva a diferentes agentes, entre ellos, micotoxinas y otras

sustancias tóxicas además de que en el intestino delgado se absorbe 80% de la aflatoxina consumida (Grenier and Applegate 2013), así como algunas otras observadas en la **Tabla 2**. Dicha barrera conformada por una monocapa epitelial, las microvellosidades, las criptas y el movimiento peristáltico intestinal pueden controlar efectivamente el acceso de patógenos siempre y cuando no exista un factor que altere cualquiera de estas fases, y en consecuencia las microestructuras pueden mejorar el transporte, la absorción y la retención de nutrientes (Sergent, Parys et al. 2006, De Walle, Sergent et al. 2010).

Tabla 2. Porcentaje de absorción de micotoxinas en duodeno.

Micotoxina	Porcentaje de absorción en duodeno
Aflatoxina	80 %
OTA	40%
DON	5-20%
Fumonisinias	1%

Determinar el grado de permeabilidad intestinal es importante como indicador de la salud intestinal ya que en las asociaciones a patógenos tiende a hacer variable esta condición del intestino. Uno de los elementos más importantes que alteran la permeabilidad intestinal son las micotoxinas, debido al consumo de granos contaminados y que en las especies productivas es esencial para la alimentación. Las investigaciones alrededor de este tema profundizan en cómo es que las toxinas tienen la capacidad de traspasar a los espacios tisulares, así como los tisulares y posterior a ello, continuar su camino sistémico hacia los órganos blanco. Sin embargo, muchas de los avances son actualmente parcialmente evolutivos (Bouhet, Hourcade et al. 2004, Akbari, Braber et al. 2017).

Los enterocitos tienen diferentes conexiones entre sí, ya que las proteínas de unión estrecha, unión adherente, uniones gap y desmosomas, posiblemente inhiben antígenos adventicios acompañados de una mayor permeabilidad de las células epiteliales intestinales. Las proteínas transmembrana como la familia de la claudina, la ocludina y las moléculas de adhesión, forman juntas las estructuras funcionales conectivas en el espacio intercelular con la participación de las proteínas de andamiaje de la zona oclusiva (De Walle, Sergent et al. 2010, Pinton, Braicu et al. 2010). La mayoría de la información presentada en los artículos

relacionados con la intoxicación por micotoxinas se centra en explicar las secuelas que dejan las toxinas y cómo se asocian incluso entre diferentes tipos. Sin embargo, no existe suficiente información que relacione temas más profundos y específicos como lo es: ¿qué ocurre con las proteínas de oclusión y cómo se modifica la permeabilidad intestinal con la presencia de AFB₁? además de ¿cómo estos intervienen con patógenos como la bacteria *Salmonella*?

1.8. Moléculas de adhesión en las uniones estrechas

Las uniones estrechas (TJ) están formadas por proteínas que se encuentran en la región apical y las membranas laterales de las células epiteliales, en general, funcionan como la barrera primaria para la difusión de componentes no solubles en las vías paracelulares (Schneeberger and Lynch 1992, Gumbiner 1993). Se han descrito que las TJ son una serie de sitios discretos de aparente fusión a los cuales se les denominó (puntos de beso) que involucran a la propia membrana plasmática y las células adyacentes (Farquhar and Palade 1963).

Bajo técnicas de microscopía electrónica de congelación por fractura, las TJ aparecen como un grupo continuo de fibrillas y las hebras intramembranas anastomosadas forman aquello conocido como “arboledas” (Staehelin 1974). En consecuencia, el progreso técnico identificó y clasificó las proteínas de las membranas periféricas, Zona Oclusal 1 (ZO-1), Zona Oclusal 2 (ZO-2), Zona Oclusal 3 (ZO-3), Zona oclusal 4 (ZO-4), cingulina, 7H6 antígeno y simplekina (Mitic and Anderson 1998, Cerejido, Contreras et al. 2004, Aijaz, Balda et al. 2006). Aunque se han realizado análisis de proteínas, la relación entre las TJ y las proteínas integrales de membranas no están completas y necesitan más información, así como desarrollar técnicas a nivel molecular para poder ayudar a la comprensión de tan importante sitio de función (Furuse, Hirase et al. 1993, Ando-Akatsuka, Saitou et al. 1996, Balda and Matter 2016).

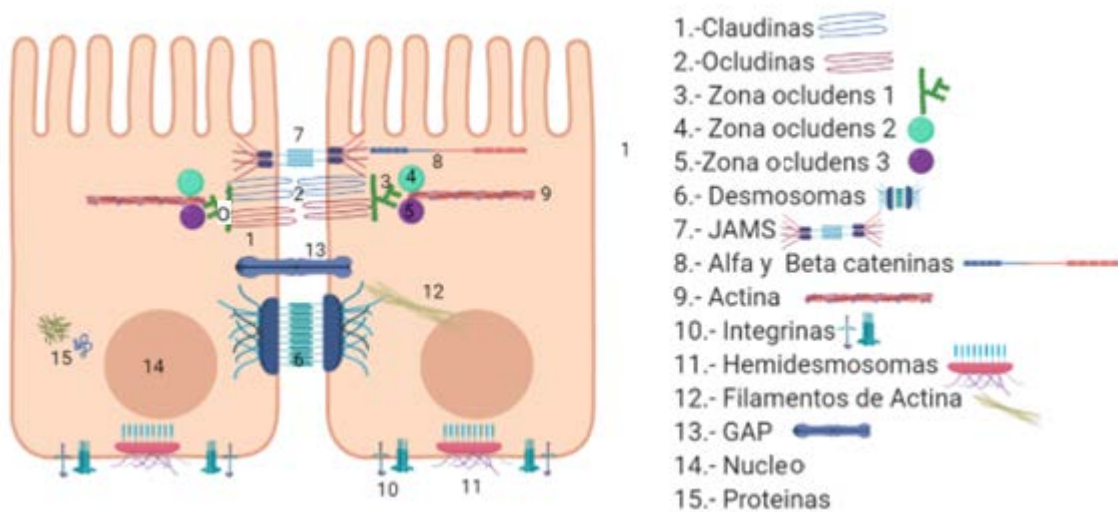
1.8.1. Interacción de la barrera intestinal y las proteínas de unión

1.8.2. Proteínas de unión estrecha

El intercambio de agua y de solutos a través de un determinado epitelio se realiza por dos vías distintas: la transcelular y la paracelular. La primera, se efectúa a través del citoplasma celular y está regulada por diversas bombas fisiológicas y

transportadores presentes en las membranas celulares. Debido a la presencia de estos sistemas, los distintos epitelios corporales presentan una especialización funcional, por ejemplo, la capacidad de los túbulos colectores renales para reabsorber agua en presencia de ADH (hormona antidiurética) o la de los hepatocitos para transportar ácidos biliares. La segunda, es responsable del transporte transcelular activo, presenta un alto grado de especificidad molecular y está estrechamente regulado. El epitelio tubular renal o el intestinal es un excelente ejemplo de estas propiedades, en donde se ven asociados incluso patógenos externos. Los mecanismos que gobiernan el transporte transcelular entre la luz tubular y la sangre han sido ampliamente estudiados y con base en estos estudios, se sabe que las proteínas de unión estrecha y múltiples proteínas más como la familia globulina, forman parte de un intestino parcialmente sano. Las proteínas de unión estrecha son proteínas en la región apical y membranas laterales de las células epiteliales, la función de éstas es establecer una barrera primaria para la difusión de componentes no solubles en la vía paracelular. Las proteínas de unión estrecha miden de 0.1-0.7 μm de ancho y tienen un rango de peso molecular de 17 a 27 kDa, están formadas por más de 40 proteínas diferentes, e involucran a las proteínas de las membranas periféricas incluyendo: proteínas de unión estrecha, JAM (moléculas adherentes a la unión), uniones GAP (canales de comunicación), proteínas adherentes a los desmosomas y proteínas adherentes a los hemidesmosomas (Aijaz, Balda et al. 2006).

Figura 3.- Proteínas de unión estrecha



(Hernandez-Ramirez, 2022)

1.8.2.1. Claudinas

Las claudinas son importantes para establecer la unión de adhesión, en estas uniones se forman poros que permiten que ciertos iones pasen a través del espacio extracelular de aproximadamente 1 nm de diámetro. Hay 23 tipos de claudinas, cada una de las cuales forma un poro extracelular diferente, por lo tanto, los epitelios pueden modificar la selectividad de su permeabilidad intercelular según el tipo de claudina que expresan. Las claudinas son una familia de proteínas y en su estructura el 38% de estas proteínas son idénticas entre cada una de ellas en la secuencia de aminoácidos. Todas tienen una proteína integral de <26 kDa. Después de haber hecho análisis de detección en tejido hepático y renal, se llegó a la conclusión de que son sintetizadas por un solo gen pero que al codificarse producen diferentes secuencias de aminoácidos en específico para claudina y ocludina (Saitou, Fujimoto et al. 1998). Más adelante se descubrió que algunas secuencias de aminoácidos principalmente de la familia claudina son precursoras de la formación de fibroblastos ya que se exponen en mayor concentración en la matriz extracelular posterior a la lesión tisular. Esto último promovió estudios profundos sobre la matriz extracelular y la reparación de tejidos asociados con claudinas en el proceso de inflamación (Kubota, Furuse et al. 1999, Tsukita and Furuse 2000).

Con el paso de las investigaciones en la ubicación de las proteínas en el entorno celular, se ha podido señalar que las claudinas se distribuyen en fibrillas proteínicas, como la claudina 1 en la cara P de la célula, mientras que la cara E se presenta de forma incontinua la claudina 2, esto es un paso importante para la revisión cuando se trata de ubicación específica de la invasión de agentes al medio paracelular. A pesar de que muchos ensayos existen acerca de las claudinas y bajo el concepto de que la expresión de éstas cambia dependiente de agentes patógenos o la vida celular, se plantea que todas las caras celulares tienen hebras de claudina para diferentes funciones. A pesar de que existen sólo 23 proteínas diferentes reportadas, no a todas estas proteínas se les han encontrado una función específica y se desconoce la interacción con patologías específicas, además se sabe que existen variaciones en la expresión de claudinas homólogas en diferentes especies como mamíferos, reptiles y aves (Furuse, Fujita et al. 1998).

El mayor avance en el conocimiento de las claudinas se encuentra en mamíferos, ya que se han identificado múltiples secuencias (claudina 1 - 23), la evolución en la localización de estas proteínas ha sido lenta porque tienen diferentes expresiones en diferentes etapas de la vida celular, que incluyen embriogénesis, células maduras, lesión celular y expresión al comienzo, así como al final de la reparación celular. Así, con el paso del tiempo, más investigadores agregan

nuevas propuestas en ese tema, forman nuevos protocolos y nuevos vínculos entre las proteínas.

Bioquímicamente, las claudinas y otras proteínas como las ocludinas están directamente asociadas con los iones de calcio, que son necesarios para la función celular. Esta explicación es notable para la asociación de la barrera intestinal, con algunos micro-minerales (Ca^{2+} , P^{3-} , Na^{+}) y están directamente relacionados con la endocitosis antes mencionada. Aunque las claudinas son similares en estructura, la expresión de éstas varía considerablemente entre los diferentes tejidos.

Por otro lado, también es necesario considerar la etapa de la vida de las especies, ya que se sabe que, a lo largo de la madurez de la etapa del individuo, se han encontrado variaciones en la expresión genética de algunas proteínas intestinales. Adicionalmente, en periodos posteriores a la lesión intestinal dejada por algún agente biológico o no biológico, se sabe que la activación de algunas proteínas de la reparación tisular es estimulada primariamente por las proteínas de unión estrecha y por lo tanto se consideran finalmente mediadoras del proceso inflamatorio (**Figura 3**). (Polak-Charcon, Shoham et al. 1980, Black and Rogers 1992, Simon, Lu et al. 1999).

1.8.2.2. Ocludinas

Las ocludinas no son estrictamente necesarias para la formación de la unión estrecha, pero son necesarias para mantener la estabilidad y la función de la barrera intestinal. La primera proteína identificada de este complejo de proteínas de unión estrecha fueron las ocludinas, éstas tienen un peso aproximado de 60 kDa, se ha encontrado que presentan un dominio C- carboxilo (terminal largo) y N – amino (terminal corto), este último dominio se representa en la cara P, por lo tanto, confieren uniones dentro del célula. Por otra parte, un par de trazas extras se extienden a lo largo del espacio extracelular abundante en residuos de tirosina unidas al dominio C. Por la poca variación que tiene esta proteína en su expresión génica, se le han atribuido funciones puntuales como lo es la regulación y la difusión de iones a través de la membrana celular, además de marcadores hidrofílicos por medio de sus dominios terminales. La permeabilidad paracelular se asocia al dominio N-amino, mientras que la señalización para la trans migración de neutrófilos la confiere el C-carboxilo. Adicionalmente, este último dominio se une a una proteína celular citoplasmática conocida como tricelulina la cual se conecta de manera estrecha con las proteínas TJP1 o Zona oclusal 1 (**Figura 3**) (Balda and Matter 2016).

1.8.2.3. Zonula Occludens

Esta familia se denominó Zonula occludens (Zo) y está compuesta por 4 diferentes proteínas (Zo-1-4) que se disponen a lo largo de la membrana celular. De este paquete proteínico perteneciente a las proteínas de unión estrecha; la primera que se localizó fue la Zo-1. Posteriormente, con el peso molecular evidenciado por Western-blot, se localizaron las otras proteínas de la serie junto a Zo-1. Por lo tanto, el peso molecular varía dependiendo de la proteína expresada (130-160 kDa), este dato es importante ya que basados en este peso molecular, se han encontrado dos variaciones de la Zo-1; un total de 80 aminoácidos conforman el dominio de cambio, un dominio α^- expresado en el endotelio vascular y células de Sertoli, mientras que el dominio α^+ se encuentra en las células epiteliales (Balda and Matter 2008). Adicionalmente, el hecho de encontrar que la Zo-1 y la Zo-2 se relacionan íntimamente con las E-cadherinas pertenecientes a las proteínas JAM encargadas de la unión célula - célula y forman parte de los canales de comunicación con las proteínas de la familia GAP (**Figura 3**).

1.8.2.4. Moléculas de unión adherente – JAM

Las proteínas Moléculas de unión adherente (JAM) son complejos de unión y forman parte de la membrana celular en el tejido epitelial, principalmente, y están ubicadas cerca de las uniones basales a las claudinas y ocludinas; su función es unir las células y los espacios laterales intercelulares. Las proteínas de las moléculas adherentes JAM forman algunas de las conexiones intercelulares, pero su función primordial es estabilizar el complejo de unión entre las células desde el punto de vista de adhesión celular. Una más de las funciones de JAM es participar en los procesos inflamatorios como parte importante del proceso de adhesión de las células CD3. Esta proteína se le categoriza en 1998 y poco después de que se le acreditara el nombre, se dio a conocer la presencia de 3 dominios JAM-A, B, y C, los cuales tienen un peso molecular entre 30 y 40 kDa, y de 31 a 36% de homología, lo que las hace aparecer variablemente en los procesos celulares. Solo JAM B y C poseen un péptido de señalización, un dominio extracelular, un segmento transmembranal y una cola citoplasmática corta. El dominio intracelular de estas moléculas interactúa con moléculas Zo, éstas a su vez forman una red que interactúa con los filamentos de actina del citoesqueleto y con otras proteínas citosólicas que desencadenan cascadas de señalización con E-cadherinas o ZONAB (Zo-1-associated nucleic acid binding proteins) (**Figura 3**) (Bazzoni 2003).

Se ha encontrado errores en la remodelación tisular relacionadas a la falta de expresión de JAM, formado así una remodelación aberrante o poco efectiva. Se conoce que las proteínas JAM son el primer complejo de unión que se construye durante el desarrollo del epitelio y aparecen antes de la expresión de proteínas de unión estrecha, por lo que actúan en procesos morfogenéticos durante el desarrollo embrionario. Al igual que las proteínas de unión estrecha, forman una estructura similar a un cinturón alrededor de las células y se adaptan en ambas caras de la célula, pero no se encuentran expresadas en la zona apical celular. En este grupo de proteínas sobresalen algunas proteínas como lo son las E-cadherinas y las nectinas las cuales son las moléculas encargadas de hacer las conexiones célula-célula con su dominio extracelular. Otro grupo representativo son las Cateninas (β - y α , p120 catenina), estas proteínas están unidas entre sí y promueven la adhesión a la zona tisular basal. Adicionalmente, al final del enlace aparece la proteína Afadina que forma parte de reacciones complejas en el espacio intercelular y es parte de la cadena de unión a la unidad de proteínas de unión estrecha como lo es con la Zo-2. Todo lo anterior funciona íntimamente para conferir una membrana celular estable (Monteiro, Sumagin et al. 2013).

Se ha establecido en algunas investigaciones que las proteínas B-catenina y Zo-1, Zo-2, y F-actina no tienen expresión cuando la barrera intestinal está comprometida por una lesión celular, con estas pruebas se demuestra la estrecha interacción entre JAM, Zo y el citoesqueleto. No obstante, estos ensayos realizados sólo muestran avances en células MDCK *in vitro* (Fanning, Jameson et al. 1998)

Aunque se requieren proteínas de unión estrecha JAM y desmosomas para mantener la integridad del epitelio, solo JAM son necesarios para los movimientos coordinados de las poblaciones de células en el epitelio. En la piel, las células maduran y se transportan a la superficie a través de todas las capas de la epidermis, por lo tanto, toda la estructura, función, inmunidad y las proteínas adherentes, necesitan cambio y adaptación. Otro ejemplo, es que, en el intestino, el nacimiento de nuevas células se inicia en la cripta y evolutivamente la célula madura se transporta a través de las vellosidades hasta el estadio final en la corona de la vellosidad, haciendo que cada etapa sea diferente en la expresión de proteínas (Kostrewa, Brockhaus et al. 2001).

1.8.2.5. Uniones comunicantes (GAP)

Las proteínas GAP son un tipo de unión celular que se caracteriza por formar un canal intercelular que se forma entre células vecinas y que permite la comunicación directa entre ellas, es decir, permite que pequeñas moléculas, iones e impulsos eléctricos se muevan entre las células sin pasar por fuera de las mismas. Las uniones GAP incluyen proteínas como selectinas, cadherinas, integrinas y la superfamilia de inmunoglobulinas. Estas proteínas proveen la comunicación intercelular a través de canales de unión. GAP es una proteína esencial para coordinar las funciones de las células en los tejidos de todos los organismos multicelulares. Los canales GAP están compuestos por hexámeros de familias medianas de proteínas integrales como las conexinas e inexas (Baker, Sosinsky et al. 1985). Estas uniones permiten el intercambio directo de iones y moléculas pequeñas (incluidos segundos mensajeros como Ca^{2+} , inositol fosfato 3 (IP3), nucleótidos y oligonucleótidos cíclicos). Las funciones proteicas GAP se han explorado mediante el estudio de mutaciones en moscas, gusanos, humanos y la alteración genética dirigida en ratones. Estos estudios han revelado una amplia diversidad de funciones en biología de tejidos y órganos (Alexopoulos, Bottger et al. 2004). El acoplamiento mediado por uniones GAP permite que grupos de células respondan a un ligando sincrónicamente, incluso cuando sólo unas pocas células expresan el receptor ligando, haciendo estable la membrana y guardando la homeostasis entre las capas en casos de reacciones post-lesión (**Figura 3**) (Goodenough and Paul 2009).

1.8.2.6. Desmosomas

Los desmosomas (Ds) al igual que las proteínas antes mencionadas pertenecen a paquete especializado de las proteínas de unión; sin embargo, también se alteran en las afecciones microbiológicas ya que sus componentes pueden disolverse por la presencia de bacterias, hongos y toxinas. Es por ello, que los Ds se convierten en blanco de varias enfermedades que comprometen la barrera intestinal y el equilibrio sistémico. Los desmosomas tienen similitudes estructurales con los hemidesmosomas que conectan las células a la matriz extracelular con la ayuda de las integrinas. La importancia crucial de los hemidesmosomas está demostrada en ratones con la inhibición de integrina $\alpha 6$ específica de células epiteliales intestinales que desarrollan colitis, éstas con una progresión natural hacia el carcinoma intestinal. Los Ds comprenden proteínas transmembrana denominadas cadherinas desmosomales. Estos se subdividen en el tipo de desmogleína y desmocolina (nombres de genes: DSG/DSC, nombres de proteínas: Dsgs/Dscs),

ambos tipos de proteínas son necesarios para la adhesión celular. Las proteínas 5,10 Dsgs/Dscs se expresan en un patrón específico de tipo celular, los miembros de la familia cadherinas son proteínas esenciales en epitelios digestivos. Estas proteínas basales se interconectan con plakoglobin 1-2, y esta última, con desmoplakina facilitando la unión al citoesqueleto de queratina (Holthofer, Windoffer et al. 2007, Nekrasova and Green 2013).

En ensayos previos se menciona, que para evaluar el intestino permeable, se usaron tratamientos en ratones a los que se les administró 0.6 mg/g de peso corporal de isotiocianato de fluoresceína dextrano (4-kDa), en la búsqueda de resultados no se activó el gen (5,10 Dsgs/Dsc) que se vincula a formación de Ds, esto con la finalidad de obtener resultados precisos. Para la obtención de datos se recogió sangre retro-orbitalmente, se evaluó la intensidad de fluorescencia en suero (excitación: 492 nm; emisión: 525 nm). Los resultados mostraron que existe un aumento en la respuesta celular a la permeabilidad al inactivar el gen, así, el resultado explica la importancia de los Ds en la barrera intestinal (**Figura 3**) (Gross, Pack et al. 2018).

1.8.2.7. Hemidesmosomas adherentes

La unión de las células a la matriz extracelular es crucial en el mantenimiento de la estructura y la integridad del tejido. En los epitelios estratificados, como en la piel, así como en otros epitelios complejos como el intestino, los complejos multiproteicos llamados hemidesmosomas están involucrados en la promoción de la adhesión de las células epiteliales a la membrana basal subyacente (Borradori and Sonnenberg 1999).

El papel de los hemidesmosomas ha mejorado considerablemente ya que solo se les conocía como proteínas presentes en la membrana basal. Por lo tanto, los avances tecnológicos en los estudios de genética molecular han aumentado el conocimiento de la función de varios componentes de estas proteínas. Una mención notable sobre los hemidesmosomas permitió la caracterización de las interacciones proteína-proteína involucradas en su ensamblaje, en particular, la integrina $\alpha 6 \beta 4$ que es una parte proteica de las proteínas de unión estrecha. Se denota que es un componente importante porque transduce señales de la matriz extracelular al interior de la célula. Además de que está modulando críticamente la organización del citoesqueleto, la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación celular. Por lo tanto, es crucial resaltar la importancia de esta proteína en los procesos, como la localización de la misma proteína dentro del citoplasma celular, ya que se expresa en el desarrollo y envejecimiento de las

células, además de estar presente en la cicatrización de heridas o la presencia activa o inactiva en la invasión tumoral.

Concluyendo, el epitelio intestinal suele ser una barrera selectivamente permeable, su función está determinada por la formación de complejos proteína-proteína, uniones de desmosomas, uniones de hemidesmosomas, uniones GAP, uniones JAM y unión estrecha. Estos últimos conectan mecánicamente las células adyacentes sellando el espacio intracelular. Durante la última década, se está prestando más atención a las uniones estrechas porque su alteración podría causar un colapso en la función de la barrera intestinal, lo que ayuda a promover reacciones inmunológicas (enfermedades autoinmunes e inflamatorias). Mientras que expertos aplican técnicas de difusión a través del gel para establecer modelos de permeabilidad paracelular selectiva y puntuar la importancia de la integridad de las proteínas de unión estrecha para proteger el tejido, tener homeostasis y evaluar el paso selectivo a través de las células. Otros investigadores desarrollan avances en las técnicas de biología molecular para establecer interacciones con patógenos simples, respuestas multi-etiológicas y la comunión de la microbiota general (**Figura 3**) (Mitic and Anderson 1998, Cerejido, Contreras et al. 2004, Du, Wang et al. 2017).

1.10. Intestino permeable

El concepto general de "intestino permeable" está presente en las discusiones actuales por algunos investigadores dedicados a las enfermedades gastrointestinales y no gastrointestinales. Las implicaciones involucran a varias especies, incluidos los humanos. Sin embargo, coexisten en otros cambios orgánicos importantes como: enfermedades neuronales degenerativas, asma, diabetes tipo 2, la esteatosis hepática, la nefrosis degenerativa, cáncer, así como la interacción de agentes como *Salmonella*, *E. coli*; estas presentaciones de enfermedad, así como las etiologías involucradas hacen menos eficientes los sistemas productivos de los animales domésticos.

Las investigaciones relacionadas al tema de salud intestinal han podido atender a problemas comunes relacionados con antígenos locales, bajo esta característica el intestino es el primer órgano que interactúa con alimento, y metabolismo de bacterias (Hollander and Kaunitz 2019). En particular, los probióticos, prebióticos y protectores tisulares, aumentan o mantienen una integridad intestinal estable. Además, el uso de estos aditivos anexos al alimento se recomienda en los tratamientos que incluyen cáncer, disbacteriosis y micotoxicosis (Quigley 2016,

Nagpal and Yadav 2017, Camilleri 2019). La premisa a la hipótesis del "intestino permeable", es que los elementos estresantes como la ansiedad, el manejo intensivo, los componentes dietéticos como los emulsionantes y las micotoxinas en los alimentos, aumentan la permeabilidad paracelular de la mucosa intestinal. En consecuencia, las bacterias patógenas, las toxinas bacterianas, los parásitos, los hongos y las micotoxinas provocan la activación de la inflamación. En muchos casos, el resultado es el aumento de la permeabilidad paracelular intestinal, donde las proteínas de unión estrecha participan principalmente. Hoy en día no existen datos precisos sobre el tejido intestinal intacto, el transporte paracelular de bacterias específicas y la interacción con micotoxinas particulares como AFB₁. Aun así, tal vez el avance sobre las muestras de biología molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede responder a más preguntas, guiando el análisis de proteínas específicas a patógenos específicos y éstas a su vez responder sobre interacciones tóxicas. En esta perspectiva, la relación entre proteínas de unión estrecha y las secuelas dejadas por los diferentes agentes es esencial para conocer más datos, es por ello que se necesitan diseñar más iniciadores "primers" y contrastarlos con los primers más comunes utilizados en la investigación dedicados a comprender el estado del intestino permeable. Por otra parte, la intención de desarrollar técnicas *in vivo* y posteriormente ser medidas bajo técnicas de PCR, tendría mucho potencial para la investigación (Deitch 2012, Odenwald and Turner 2017).

Por lo anteriormente expuesto, es relevante conocer a profundidad las interacciones que se llevan a cabo en el intestino de las aves de engorda y la asociación con patógenos como lo son las aflatoxinas y *Salmonella*. Adicionalmente, conocer la capacidad que tienen estos patógenos de modificar las características fisiológicas del intestino y cómo éstas impactan la salud general del ave.

2.0 JUSTIFICACIÓN

Un intestino en homeostasis desde el punto de vista de la producción animal, indica un potencial efecto positivo para una conversión alimenticia efectiva; sin embargo, en la actualidad, las investigaciones asociadas a la permeabilidad intestinal en el pollo de engorda son relativamente escasas. Por lo tanto, esto lleva a desconocer los mecanismos específicos de cómo agentes comunes como la *Salmonella* y las aflatoxinas modifican el entorno celular y, principalmente, cómo alteran la permeabilidad intestinal. Consecuentemente, esta investigación pretende generar información básica de la interacción de dos agentes patológicos comúnmente encontrados en la industria avícola (aflatoxina B₁ y *Salmonella* enterica) causantes de pérdidas económicas importantes. Adicionalmente, se pretende generar información acerca de las consecuencias sobre la modificación del tracto intestinal en el entorno luminal.

3.0 HIPÓTESIS

La presencia de aflatoxina B₁ y *Salmonella enterica* Serovar enteritidis, aumentará la permeabilidad del marcador isotiocianato de fluoresceína dextran (FITC-D) en las aves engorda y aumentará la translocación bacteriana a nivel intestinal, disminuyendo significativamente los parámetros productivos a los 21 días del ciclo productivo avícola.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la integridad de la barrera epitelial en aves de engorda expuestas a aflatoxina B₁ y desafiadas con *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis utilizando la prueba de permeabilidad de isotiocianato de fluoresceína dextran (FITC-D) y observar cómo estos dos factores impactan la producción avícola.

4.2 Objetivos particulares

- Exponer a las aves a la aflatoxina B₁ (470 µg/Kg), *Salmonella enterica* Serovar enteritidis (1x10⁸ UFC) y su combinación, para evaluar el paso de FITC-D a través de los enterocitos afectados por estas etiologías.
- Evaluar en cada uno de los tratamientos los parámetros productivos como son el peso vivo corporal, el consumo de alimento, el índice de conversión alimenticia y la tasa de mortalidad para comparar los efectos negativos de AFB₁ y *Salmonella*.
- Evaluar algunos parámetros selectos de la bioquímica sanguínea como: proteínas totales, albúmina, globulinas, colesterol, glucosa y proteína C reactiva. Adicionalmente, se evaluará la actividad de las enzimas gama-glutamyl-transpeptidasa (GGT), aspartato-aminotransferasa (AST) y alanino-aminotransferasa (ALT) para determinar el efecto bioquímico provocado por Aflatoxina B₁ y *Salmonella*.

- Estimar el peso relativo de los órganos (hígado, riñón, intestino, bolsa de Fabricio y bazo como comparativo entre los tratamientos *Salmonella* y AFB₁.
- Cuantificar los niveles de inmunoglobulina A (IgA) intestinal por medio de técnica de inmunoensayo ELISA para evaluar el estatus en inmunoglobulinas de superficie en presencia de AFB₁ y *Salmonella*.
- Evaluar las lesiones histopatológicas por técnica de Gram en el hígado de las aves tratadas
- Evaluar tejido hepático de las aves tratadas con la técnica de tinción de Gram y posteriormente digitalizar y procesar las micrografías obtenidas por medio de un software de análisis óptico: Image Processing and Análisis in Java (ImageJ® - University of Wisconsin-Madison) con la finalidad de evidenciar la traslocación bacteriana.

5.0 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Se adquirieron 200 pollos de engorda, machos, estirpe Ross 308, de un día de edad de la compañía CAMPI-BACHOCO (Av. Tecnológico No. 401, Cd. Industrial, C.P. 38010, Celaya, Guanajuato). Las aves se distribuyeron aleatoriamente en 4 tratamientos.

El desarrollo del experimento se llevó a cabo en la nave de Investigación Avícola de la Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Cuautitlán (**Figura 4**).

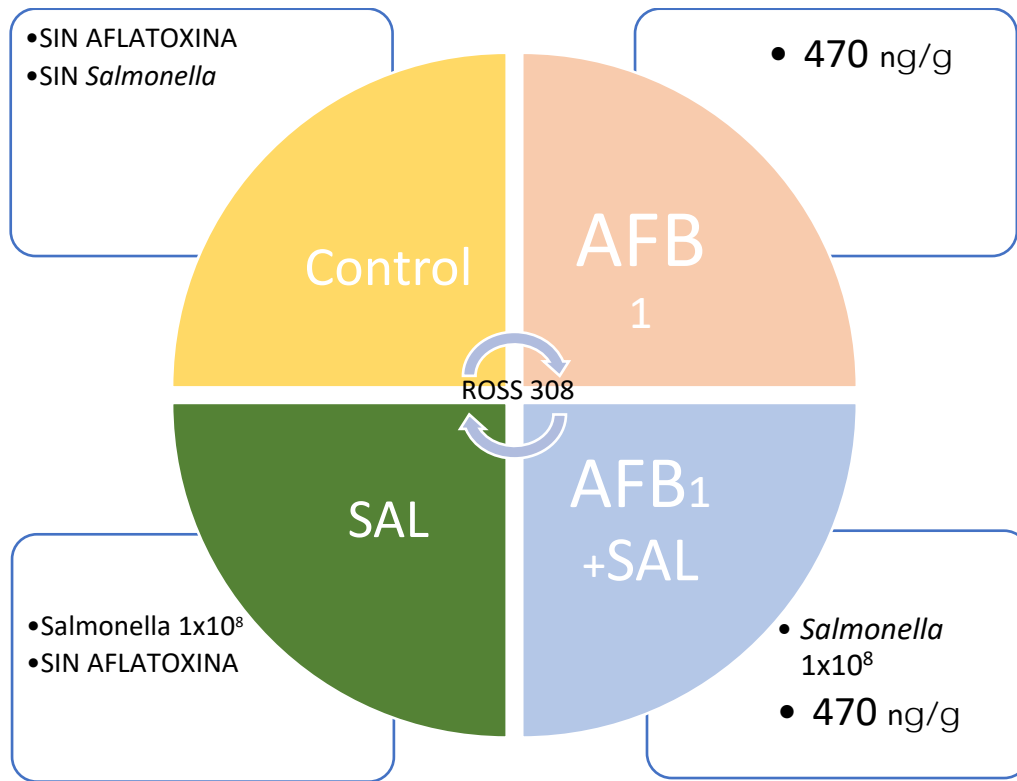
Figura 4. Nave de producción avícola – FES- Cuautitlán-UNAM



Hernández-Ramírez, 2022.

Las aves se agruparon en 5 réplicas por tratamiento y 10 aves por réplica (n= 50/tratamiento). Los tratamientos se organizaron de la siguiente manera: CT, pollos alimentados con una dieta sin la presencia de AFB₁; AFLA, pollos alimentados con una dieta contaminada con AFB₁ (470 µg/Kg); SAL, pollos alimentados con una dieta sin AFB₁ e infectados con 10⁸ UFC de *S. enteritidis*. por ave a los 18 días de edad; AFLA + SAL, pollos alimentados con una dieta contaminada con AFB₁ (470 µg/Kg) e infectados con 10⁸ UFC de *S. enteritidis* por ave a los 18 días de edad (**Figura 5**). Se dosificó agua y alimento a libre acceso, adicionalmente el ajuste de la temperatura fue gradual según las indicaciones del manual Ross 308 (Ross 308, 2018).

Figura 5. Distribución de los tratamientos



Los pollos fueron alimentados con una mezcla de concentrado proteico base maíz/soya en presentación de harina gruesa obtenido de la compañía Nutrición Técnica Animal. En la dieta control, no se encontraron niveles de AF, toxina T-2/toxina HT-2 y fumonisinas totales. Los contenidos evaluados de estas toxinas estaban por debajo de los límites de detección de las técnicas de columna de inmunoafinidad empleadas AF <1 ng/g, toxina T-2/toxina HT-2 <100 ng/g, fumonisinas totales <0.016 mg/Kg). El DON estuvo presente en un nivel de 0.05 mg/Kg.

5.2. Dieta contaminada con aflatoxinas

5.2.1 Producción de las aflatoxinas

La producción de las aflatoxinas se llevó a cabo en las instalaciones del L14 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Universidad Nacional Autónoma De México, Campo 4.

Se empleó maíz amarillo, el cual se sometió a un proceso de limpieza manual con la finalidad de quitar aquellos granos que pudieran estar rotos, pigmentados o sucios. Posteriormente, se evaluó la presencia de aflatoxinas totales por medio de columnas de inmunoafinidad (método 991.31 de la AOAC) marca VICAM-AFLATEST (Lee, Rachaputi et al. 2005). Se inocularon lotes de 1 kilogramo de maíz con una cepa del hongo *Aspergillus flavus* obtenida de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, identificada con el número de cepa #28 productora de AFB₁ y AFB₂. Se preparó una suspensión de esporas a una concentración de 1,556,000 esporas/10 mL y ésta se aforó a 100 mL. Se analizó la humedad del maíz con un determinador de humedad Motomco 919 y se obtuvo un resultado de 12% de humedad. La humedad se ajustó a 19% para favorecer el crecimiento del hongo (Martínez, Badillo et al. 2000). El tiempo de incubación fue de 28 días a una temperatura promedio de 28 °C y humedad relativa del >85-90 %. En la **Figura 6** se muestran los cultivos de maíz con el hongo *Aspergillus flavus*.

Figura 6. Cultivo de *Aspergillus flavus* para la obtención de las aflatoxinas.



5.3 Determinación de las aflatoxinas

Se realizó la determinación de aflatoxinas totales (día 28. Para la evaluación se siguió la metodología 991.31 de la AOAC).

Previo a la determinación, para frenar el crecimiento fúngico y la eliminación del hongo, se esterilizó el maíz inoculado en una autoclave (120°C, 15 Psi, 15 min).

Se utilizaron 100 g de muestra a la cual se le adicionó 10g de sal (NaCl), 200 mL de metanol:agua destilada (80:20), y se licuaron durante 1 minuto a alta velocidad, obteniendo un extracto el cual se hizo pasar a través de un papel filtro aflautado. Posteriormente, se utilizaron 10 mL del filtrado y se mezclaron con 40 mL de PBS Tween 20 al 0.1%. Esta última mezcla fue filtrada nuevamente con microfibra de vidrio de 1.0 μm . Finalmente, el filtrado (10 mL) se hizo pasar por una columna de Inmunoafinidad Aflatest® (VICAM). Un mililitro de metanol grado HPLC fue pasado por la columna de inmunoafinidad para recuperar las aflatoxinas y, posteriormente, se reaccionó con revelador VICAM (solución de bromo al 0.003%). La lectura se realizó en un Fluorómetro VICAM Series-4EX (**Figura 7**).

Figura 7. Equipo utilizado para la determinación de las aflatoxinas por fluorometria (VICAM).



Una vez conocidos los contenidos de aflatoxinas totales, se utilizó la técnica de UPLC para conocer el contenido de AFB₁ y AFB₂. Las aflatoxinas se analizaron

siguiendo las recomendaciones de Jardon-Xicotencatl et al., usando la técnica de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) con un sistema Waters ACQUITY H-Class (**Figura 5**) que incluye un sistema de administración de solventes cuaternario, una columna de fase reversa ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm), y un detector de fluorescencia optimizado (Waters, MA, EE. UU.). Los límites de detección fueron de 2.01 y 0.58 ng/Kg para AFB₁ y AFB₂, respectivamente. El porcentaje de recuperación para esta metodología fue del 92% con un error estándar de 1.2 y un coeficiente de variación de 4.7%. La **Figura 5** muestra el equipo utilizado para la determinación de aflatoxinas totales.

Figura 5. Equipo ACQUITY UPLC Systems



Waters.com

5.4 Mezcla del alimento con las aflatoxinas

Posterior a la fase de contaminación del maíz, éste fue molido por ruptura de golpe de martillo y se cribó con una malla de 0.5 mm Ribbon modelo MH-7050 (Molinos Pulvex, CDMX). El producto cribado fue mezclado con alimento balanceado comercial.

Se utilizaron lotes de 15 Kg de alimento comercial, los cuales fueron contaminados con 36 g. de maíz molido contaminado con aflatoxinas por cada Kg de alimento. Con la finalidad de asegurar la distribución homogénea de las aflatoxinas, se mezcló durante 15 minutos en una mezcladora de cinta MH-750 (Molinos Pulvex, CDMX). La dieta control fue también acondicionada con 3.6% de harina de maíz libre de aflatoxinas.

Un total de 4 dietas fueron preparadas para los diferentes tratamientos, todas ellas fueron preparadas sin fármacos anticoccidiales, antibióticos promotores de crecimiento (APC) y vitaminas excedentes. La composición de la mezcla se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 2. Composición de la mezcla de alimento para la dieta experimental

Ingrediente		g/Kg	
Maíz	574.5	Premezcla vitamínica 1	1.0
Soya	346.6	Premezcla mineral 2	1.0
Aceite vegetal	34.5	Antioxidantes 3	0.5
Fosfato de calcio	18.6	Energía metabolizable (MJ/Kg)	12.7
Carbonato de calcio	9.9	Proteína cruda	221.5
Sal	3.8		
DL-Metionina	3.3		
L-Lisina HCL	3.1		
Treonina	1.2		
Clorhidrato de colina 60%	2.0		

5.5 Reproducción de la cepa de *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis

Se usó la cepa *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (bacteriófago tipo 13A) suministrada por el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios del USDA (Ames, IA, USA). La cepa es resistente al ácido nalidíxico (20 µg/ml) y novobiocina (25 µg/ml). Brevemente, se agregaron 100 µL de *S. Enteritidis* de una alícuota congelada en 10 mL de caldo de soya tripticasa y se incubó a 37 °C durante 8 h. Posteriormente, se realizaron 3 pases consecutivos cada 8 h para garantizar que todas las bacterias se encontrasen en la fase logarítmica. Seguido, las bacterias se lavaron 3 veces con solución salina estéril al 0.9% por centrifugación a 1864 x g durante 10 min, se reconstituyeron en solución salina, se cuantificaron por espectrofotometría y se diluyeron a 1×10^8 UFC/mL. Las aves fueron desafiadas oralmente con 10^8 UFC de *S. Enteritidis* a los 18 días de edad.

5.6 Manejo zotécnico

El objetivo de la recepción en general es dar uniformidad en el manejo (Zuidhof, Holm et al. 2015). Se implementaron sistemas de desinfección para prevenir la entrada de patógenos a la nave. El equipo y el personal se desinfectaban antes de ingresar a las instalaciones (Ross-308 2018).

La necesidad de temperatura de las aves de corral fue menor, a medida que aumentó la edad; adicionalmente la masa corporal de las aves fomenta este evento (Grenier and Applegate 2013). Se sabe que los polluelos son incapaces de regular su propia temperatura corporal, por lo que requieren de una temperatura ambiental óptima de 32.2°C y un nivel de humedad entre 60 y 70% durante los 3 primeros días. La temperatura y la humedad relativa se deben monitorear frecuente y regularmente, por lo menos tres veces al día y diariamente a partir de entonces. Todos los programas de iluminación deben proporcionar un fotoperiodo prolongado, como por ejemplo 23 horas de luz y una hora de oscuridad durante las primeras etapas del desarrollo, hasta los 7 días de edad. Este manejo de luz se utilizó para asegurar que los pollos tuvieran un buen consumo de alimento (Ross-308 2018).

5.7. Registro de las variables

Para el registro de las variables productivas se levantaron los datos de peso vivo corporal, el cual se realizó de manera individual por semana, así como el cálculo acumulado. El consumo de alimento fue registrado semanal y acumulado, y de igual manera el índice de conversión alimenticia semanal y acumulado.

Para tomar los datos de pesaje, se utilizó una báscula digital, para pesaje individual de los pollos; así como registros semanales de gramos de consumo de alimento y gramos de alimento rechazado por semana por cada corraleta hasta el final del experimento.

Para conocer el índice de conversión alimenticia por semana, se realizó el cálculo diferencial entre el alimento ofrecido y el alimento rechazado, dividido entre la ganancia semanal para cada tratamiento (Quintana 1999). Para el registro de los datos de la mortalidad de las aves, se registró el peso de las aves muertas, y se procedió con la necropsia para poder evaluar las lesiones y descartar diagnósticos asociados a los tratamientos en cada caso.

5.8. Técnica de necropsia

La realización de la necropsia se hizo con la finalidad de extraer órganos de los diferentes tratamientos para su posterior fijación con solución de formalina al 10%. Se realizó la necropsia para cada caso conforme al Manual de Necropsias de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Cardenti et al., 2008). Una vez que se realizó la extracción de órganos sistemática y ordenadamente se procedió a hacer el pesaje de los órganos de forma independiente para cada ave, todo esto para valorar y tener un índice morfométrico con el fin de ponderar el tamaño del ave y su relación con el tamaño de los órganos.

Se llevó un control en un tabulador donde se especificó el peso del ave, así como de cada órgano: hígado, riñón, bazo, bolsa cloacal, estómago muscular, intestino. Posterior a ello, se utilizó una solución amortiguada de formalina al 10% y se colocó una muestra de cada tejido para su conservación y para su posterior procedimiento histopatológico, esto último con la finalidad de encontrar lesiones sugestivas por toxicidad causado por las aflatoxinas y la interacción con *Salmonella*.

5.9 Toma de muestras

A los 21 días de edad, se seleccionaron al azar para cada tratamiento 3 aves de cada replica y se extrajo sangre mediante punción cardiaca, bajo anestesia (las aves se expusieron durante 1 minuto a dióxido de carbono al 40%, 30% de oxígeno y 30% de nitrógeno)(Coenen, Smit et al. 2000). Posterior a ello, se realizó la preparación para la conservación del suero, lo cual consistió en colocar los tubos de colección de sangre (VENOSAFE de TERUMO Laboratory) en una centrifuga a 2680 x g durante 10 min. Una vez terminado el proceso, el suero se conservó en tubos para microcentrífuga (Eppendorf 022364111 Flex-tube); en congelación a -20 °C.

El suero recolectado se templó a 28 °C y, posteriormente, se realizó el análisis de la bioquímica sanguínea por espectrofotometría utilizando kits comerciales (BioSystems, Barcelona, España). Las enzimas, gama-glutamyl-transpeptidasa (GGT), aspartato-aminotransferasa (AST) y alanino-aminotransferasa (ALT) fueron evaluadas de forma independiente, y se determinó para cada una de ellas el efecto bioquímico provocado por Aflatoxina B₁ y *Salmonella*.

5.10 Cuantificación de IgA

Para cuantificar la cantidad de IgA en el intestino, se usó un kit comercial ELISA indirecto de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bethyl Laboratories Inc., TX, USA). Inicialmente se preparó la solución diluyente, la solución buffer, el conjugado de la enzima y el calibrador IgA. Una vez que las condiciones de los reactivos estuvieron listas, a los pozos de la placa de ELISA se agregaron los reactivos estándares, así como los contenidos intestinales y la solución de paro (stop), una vez transcurrido el tiempo de la técnica se procedió a la lectura. Para la lectura de las muestras se utilizó un lector de placas de ELISA (BioTek Instruments Inc., VT, EE. UU.) a una longitud de onda de 450 nm.

5.11 Isotiocianato de fluoresceína-dextran (FITC-D) como biomarcador de la permeabilidad intestinal

En el día 21 del experimento, se seleccionó aleatoriamente a 15 animales de cada tratamiento, y una hora antes del sacrificio, se les dosificó vía sonda gástrica (28.5cm 5fr Nutricat) isotiocianato de fluoresceína-dextran (FITC-D - Merck aA, Darmstadt, Alemania) a un contenido de 8.32 mg/Kg peso vivo corporal (Baxter, Merino-Guzman et al. 2017).

Posteriormente, se tomó muestra de sangre para la extracción de suero y conservación a -4°C hasta su procesamiento. La concentración de FITC-D en el suero de las aves tratadas se determinó usando un espectrofotómetro de fluorescencia LS-55 (Perkin Elmer, MA, USA). El rango del espectro fue de 350-600 nm empleando una longitud de onda de excitación de 365 nm.

Se calculó la concentración de FITC-D usando como referencia una curva de calibración, para esto se utilizó el programa Peakfit 4.12 (Systat Software Inc.).

5.12 Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) adaptado a un modelo factorial 2×2 utilizando el procedimiento del modelo lineal generalizado (GLM) en el software Statistical Analysis System versión 8.0 (SAS 2002). Las medias se separaron mediante el procedimiento de Tukey y se consideró significativamente diferente si $p < 0.05$. Además, se realizó la prueba no

paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar el análisis histopatológico, lo anterior con un nivel de significancia establecido en $p < 0.05$.

6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Índices productivos

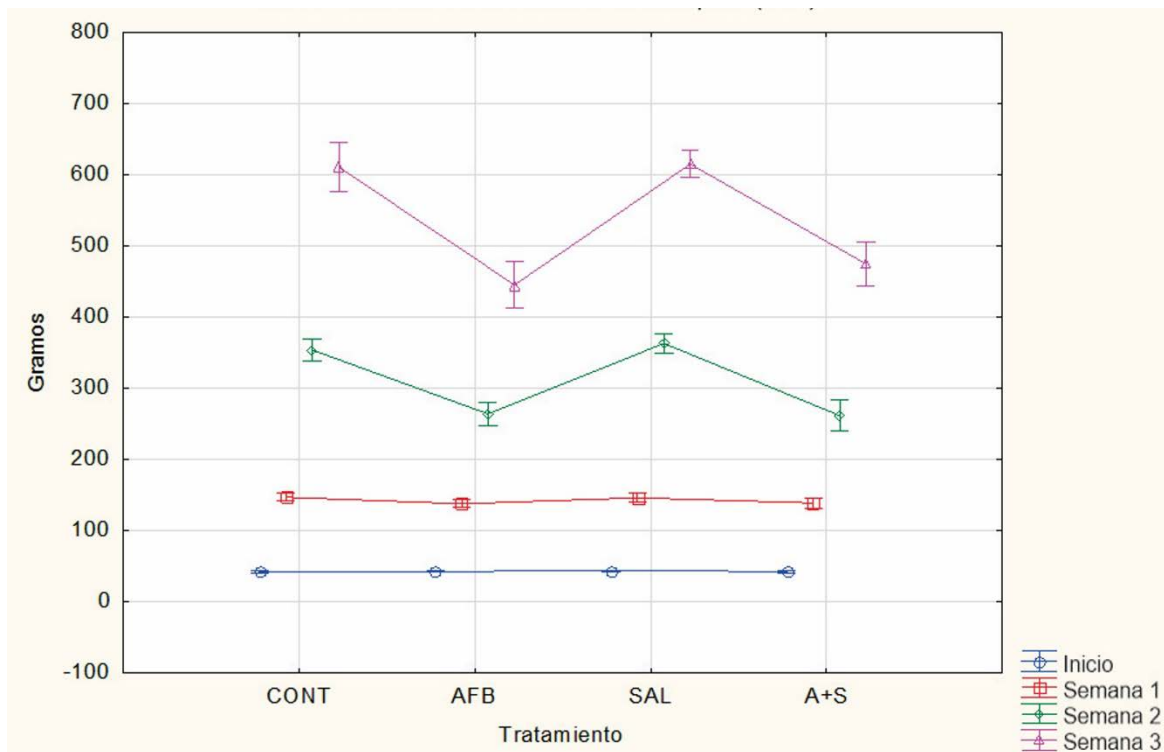
6.1.1 Ganancia diaria de peso

La ganancia diaria de peso no manifestó diferencia significativa en la primera semana en ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$): sin embargo, para los datos consecuentes en los días 14-21 los pollos que en su tratamiento contenían dieta contaminada con AFB₁ la ganancia de peso se redujo significativamente al final del tratamiento ($p < 0.05$), AFLA 31.4 % y AFLA+SAL 29.6 %. Como se observa en la **Tabla 12**.

Tabla 3. Efectos de la dieta contaminada con aflatoxinas y la infección por *S. enteritidis* en la ganancia de peso, el índice de conversión alimenticia, y la tasa de mortandad en pollos de engorda a los 21 días.

Variable	Tratamiento			
	CT	AFLA	SAL	AFLA + SAL
GP (Ganancia de peso, g)				
1 a 7 días de edad	104.5 ± 1.7a	94.7 ± 1.7a	103.0 ± 4.8a	96.0 ± 2.3a
7 a 14 días de edad	206.6 ± 5.0a	129.1 ± 5.3b	216.7 ± 4.8a	126.3 ± 7.0b
14 a 21 días de edad	257.0 ± 12.2a	178.1 ± 11.6b	251.9 ± 7.7a	190.3 ± 12.5b
1 a 21 días de edad	568.1 a	401.9 b	571.6 a	412.6 b
Diferencia al tratamiento CT (%)	0	- 31.4	- 2.5	- 29.6
ICA (Índice de conversión alimenticia)				
1 a 7 días de edad	1.12a	1.10 ^a	1.18a	1.15a
7 a 14 días de edad	1.23a	1.64b	1.26a	1.60b
14 a 21 d días de edad	1.28a	1.80b	1.31a	1.81b
TM (%)	0a	8b	0a	10b
Media de 5 repeticiones de 10 aves cada una por tratamiento (menos la mortalidad) ± error estándar. Literales diferentes dentro de la misma fila muestran diferencia estadística significativa (Prueba de Dunnett $p < 0.05$). GP. Ganancia de peso, ICA. Índice de conversión alimenticia, TM. Tasa de mortandad.				

Figura 6. Peso de pollos contaminados con Aflatoxina y *S. enteritidis*



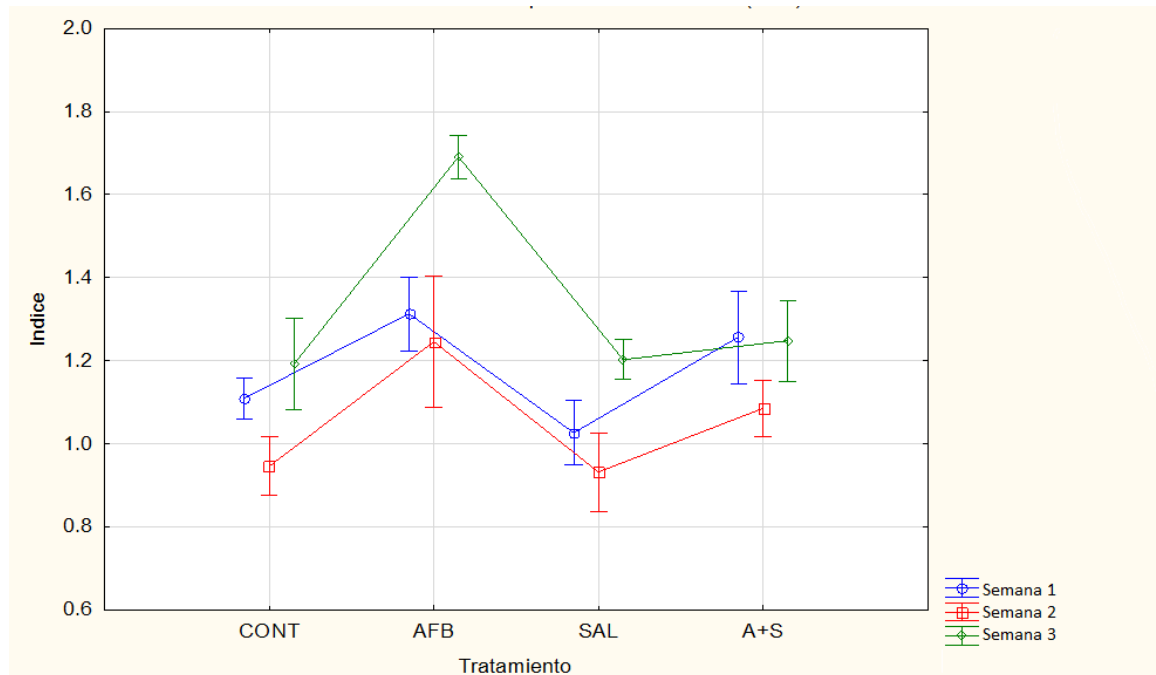
Control = Sin aflatoxina, sin *Salmonella*, AFB = (AFB₁ 500 µg/Kg); SAL = (*Salmonella entérica* Serovar enteritidis 1x10⁸ UFC); A+S = (AFB₁ 500 µg/kg + *Salmonella entérica* Serovar enteritidis 1x10⁸ UFC)

6.1.2 Índice de conversión alimenticia

Como consecuencia de los diferentes tratamientos los datos como son la ganancia de peso semanal y ganancia de peso acumulada en el día 21, sobresale el índice de conversión alimenticia ya que estos índices se vieron afectados principalmente en los tratamientos con aflatoxina, este efecto evolutivo se observa en la **Figura 6**, haciendo que los pollos con tratamientos con AFB₁, consumieran más alimento, pero no aumentarían de peso, este efecto se observa en el **Tabla 12**.

Aunque no hubo un efecto estadísticamente significativo sobre los índices productivos en los pollos desafiados con *S. Enteritidis*, se observó una ligera reducción en el índice de conversión durante la última semana (**Tabla 6**). Se hace notar que la infección por *S. Enteritidis* sólo tuvo efecto durante 3 días de la última semana de tratamiento y no se consideraron más días a manera de reinfección.

Figura 7. Índice de conversión de alimento en pollos contaminados con Aflatoxina y *S. enteritidis*.



Control = Sin aflatoxina, sin *Salmonella*, AFB = (AFB₁ 500 µg/Kg); SAL = (*Salmonella* entérica Serovar enteritidis 1x10⁸ UFC); A+S = (AFB₁ 500 µg/Kg + *Salmonella* entérica Serovar enteritidis 1x10⁸ UFC)

6.1.3 Tasa de mortandad

La tasa de mortalidad en los tratamientos con aflatoxina demostró más animales susceptibles por el tratamiento, sin embargo, en los tratamientos CT y SAL, no existieron bajas de animales, observándose una diferencia marcada con respecto a los tratamientos AFB y AFB+SAL.

Después de los análisis a 21 días, se observó que en los tratamientos con AFB₁ se obtuvieron valores negativos, fueron evidentes los cambios en lo referente a la ganancia de peso, índice de conversión alimenticia y tasa de mortandad Algunos autores como (Keller, de Oliveira et al. 2012), (Raju, Rao et al. 2005) y (Sapcota, Islam et al. 2006), mencionan que en dietas para pollo de engorda desde 300 ng AFB₁/g y 540 ng AFB₁/g, impactan de manera negativa sobre los diferentes

parámetros zootécnicos como lo es la ganancia de peso, además de afectar negativamente las proteínas séricas y el colesterol, a la par de lo anterior mencionado se refiere que estos datos fueron obtenidos de pollos de engorda a 21 días de edad en condiciones experimentales similares a las que se presentan en este escrito.

6.2 Bioquímica sanguínea

Los resultados en los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de proteína total, albúmina, globulina, glucosa, y colesterol para los tratamientos que contenían aflatoxina, a diferencia de los tratamientos CT y SAL, como se observa en la **Tabla 13**.

En los tratamientos CT Y SAL, estos demostraron datos sin diferencia estadística entre ellos ($p > 0.05$); Los tratamientos que contenían AFB₁ demostraron los efectos negativos de la dosificación de la toxina observando similitud entre estos, no obstante, la integración de Salmonella no amplificó en gran escala los efectos negativos de esta ($p > 0.05$).

En el caso de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) demostró un aumento de los niveles enzimáticos en los tratamientos con AFB₁; sin embargo, entre los tratamientos CT y SAL solo existió una diferencia porcentual del 10%, indicado la efectiva toxicidad de AFB₁; concluyentemente, se observó una separación de datos de hasta 81% entre AFLA+SAL y CT ($p < 0.05$). Así mismo, la relación AST:ALT aumentó 1.7 veces en los tratamientos que consumieron la dieta contaminada con AFB₁, los niveles en general para los tratamientos con *S. enteritidis* no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (**Tabla 12**).

Tabla 4. Efectos de la dieta contaminada con aflatoxinas y la infección por *S. enteritidis* en la bioquímica sanguínea e IgA total intestinal en pollos de engorda a los 21 días.

Constituyente	Tratamiento			
	CT	AFLA	SAL	AFLA + SAL
Proteínas totales (g/L)	29.4 ± 0.4a	18.8 ± 0.3b	28.0 ± 0.9a	19.1 ± 0.4b
Albumina (g/L)	11.7 ± 0.6a	8.6 ± 0.2b	11.9 ± 0.4a	8.2 ± 0.3b
Globulina (g/L)	17.7 ± 0a	10.2 ± 1.0b	16.1 ± 0.5a	10.9 ± 0.4b
Glucosa (mg/dL)	418.8 ± 5.5a	318.1 ± 7.1b	408.5 ± 3.1a	317.7 ± 8.8b
Colesterol (mg/dL)	147.1 ± 2.5a	87.0 ± 1.3b	135.6 ± 1.1a	86.6 ± 1.9b
AST (U/L)	128.7 ± 3.0a	225.8 ± 1.3b	115.7 ± 1.9a	233.4 ± 5.0b
ALT (U/L)	18.2 ± 0.9a	18.3 ± 0.5a	18.3 ± 0.5a	18.6 ± 0.4a
AST:ALT proporción	7.1 a	12.3 b	6.3 a	12.5 b
IgA Intestinal (ng/ml)	5770 ± 799a	6623 ± 866a	9394 ± 616b	7857 ± 291a

Media de 5 repeticiones y 3 aves por tratamiento (n=15) ± error estándar. Literales diferentes dentro de la misma fila muestran diferencia estadística significativa (Prueba de Dunnett p<0.05).

6.3 IgA total intestinal

La evaluación de la IgA entre los diferentes tratamientos fue homogénea como se muestra en la **Tabla 13**; sin embargo, para el tratamiento con *S. enteritidis* que se observó diferencia significativa comparando con los tratamientos CT, AFLA+SAL (p<0.05).

La respuesta en el tratamiento SAL se observó con 9394 ng/ml de IgA en el suero de las aves, con diferencia al tratamiento CT de 5770 ng/ml (p<0.05). Por otra parte, en el tratamiento AFLA+SAL no se observó diferencia significativa p<0.05 con CT. El tratamiento SAL evidenciado como el único tratamiento donde existió diferencia estadística (p<0.05) relacionando que existe un aumento de la respuesta antigénica en organismos parcialmente sanos; al contrario, con el tratamiento AFB+SAL en donde la respuesta fue de un 16.36% menor.

Los resultados en la bioquímica sanguínea de los tratamientos con AFB₁, denotaron una disminución en los niveles de algunos analitos, ejemplo de esto es el tratamiento control el cual se consideró como base para comparar. Dentro de la lectura de analitos se consideraron: proteínas totales, albumina, globulina,

glucosa, colesterol, AST, ALT obteniendo efectos negativos para los diferentes tratamientos sumando a esto, los datos se observaron diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), principalmente para los tratamientos con AFB₁ y no así para el tratamiento SAL, después de lo anterior, debe considerarse que el tratamiento SAL se puede considerar como un tratamiento en fase aguda de la exposición a *Salmonella* comportándose muy similar al tratamiento control.

Nazarizadeh y cols., 2019, expusieron a aves de engorda de 21 días con 3 diferentes dietas, 3 diferentes dosis de aflatoxina y 3 diferentes adsorbentes de micotoxinas, observando una disminución significativa en los índices productivos, cambios negativos importantes en la morfometría de órganos como lo es hígado, corazón y estómago muscular, además, al medir la bioquímica sérica, demostraron que en contenidos en dieta de 2 µg/g, el efecto negativo de la toxicidad por aflatoxina era evidente, observando disminución de los niveles séricos como lo son colesterol, proteínas totales y albumina (Nazarizadeh and Pourreza 2019), efectos similares se observaron en los ensayos de (Keller, de Oliveira et al. 2012), (Raju, Rao et al. 2005) y (Sapcota, Islam et al. 2006).

Los resultados de este ensayo evidenciaron que la expresión de IgA aumentó hasta 9394 ng/ml en los pollos desafiados con *S. enteritidis* (únicamente), a pesar del periodo corto de la inoculación por vía oral, mientras que las aves del grupo CT mostraron un nivel de 5770 ng/ml ambos con diferencia estadística ($p < 0.05$) (**Tabla 13**). Es importante evidenciar que los datos no son estadísticamente diferentes entre CT y AFLA+SAL (7857 ng/ml) ($p > 0.05$). Por lo tanto, estos resultados pueden ser importantes para investigaciones futuras ya que se sabe que la AFB₁ disminuye la respuesta inmunológica desde 200 ng/g (Tessari, Oliveira et al. 2006, Husáková, Bobíková et al. 2015).

6.4 Peso de órganos de las aves

En el peso relativo de los órganos (mg/100 g de peso vivo corporal) se observó un marcado aumento entre los tratamientos que contenían AFB₁ con diferencia significativa ($p < 0.05$), este efecto fue, principalmente, para el hígado y el riñón. Siendo hasta un 94% más pesado el hígado en el tratamiento CT y hasta un 68% el tratamiento AFLA+SAL (**Tabla 14**). En lo que respecta al riñón, los datos muestran una similitud a los resultados de hígado, esto se explica dado que en el tratamiento CT y SAL existe una diferencia entre ellos de 0.03%, no obstante, el tratamiento AFLA+SAL es 86% más pesado.

Por otra parte, la bolsa cloacal presentó un cambio importante en el peso orgánico siendo 1.31 veces más pesado que el tratamiento CT con diferencia significativa entre los demás tratamientos ($p < 0.05$). Adicionalmente, la relación bolsa cloacal:Bazo es más alta para los tratamientos AFLA y AFLA + SAL.

Tabla 5. Efectos de la dieta contaminada con aflatoxinas y la infección por *Salmonella Enteritidis* en peso relativo de órganos en pollos de engorda a los 21 días.

Órgano	(mg/100 g de peso vivo corporal)			
	CT	AFLA	SAL	AFLA + SAL
Hígado	3154 ± 160a	6123 ± 254b	3333 ± 136a	5318 ± 286b
Riñón	889 ± 58a	1546 ± 134b	858 ± 44a	1654 ± 149b
Bazo (B)	154 ± 19a	153 ± 24a	164 ± 20a	185 ± 37a
Bolsa de Fabricio (F)	86 ± 18a	163 ± 29b	139 ± 43b	199 ± 38b
F:B relación	0.6a	1.1b	0.8a	1.1b

Media de 5 repeticiones y 3 aves por tratamiento (n=15) ± error estándar. Literales diferentes dentro de la misma fila muestran diferencia estadística significativa (Prueba de Dunnett $p < 0.05$).

En la toma de muestras se consideraron órganos que son importantes en el metabolismo involucrado con la toxicidad producida por las aflatoxinas, la morfometría de estos órganos se ponderó para estimar los resultados contrastando el tamaño final del ave, los órganos como son: el hígado, el riñón, la bolsa de Fabricio y el bazo fueron evaluados, para posteriormente ser muestreados y fijados para su observación histológica. Los resultados mostraron que existe una disminución en el tamaño de los tejidos con las dietas que contenían aflatoxinas, incluso observándose el mismo comportamiento del efecto de *Salmonella* en los tratamientos. Los resultados mostraron diferentes con mucha distancia entre ellos para el peso del hígado el cual fue 1.9 veces más grande el tratamiento control. Las características histológicas de estos tejidos se discutirán más adelante. Nazrizadeh (2019) así como Salem y cols., 2018, realizaron un ensayos en aves de producción con una dosis de AFB₁ (0.25 mg/Kg) en donde se observaron cambios negativos en los índices de ganancia de peso, diferencias notorias en el peso de órganos, así como incremento en la mortalidad (Salem, El-Habashi et al. 2018) (Nazarizadeh and Pourreza 2019).

6.5 Hallazgos macroscópicos y microscópicos

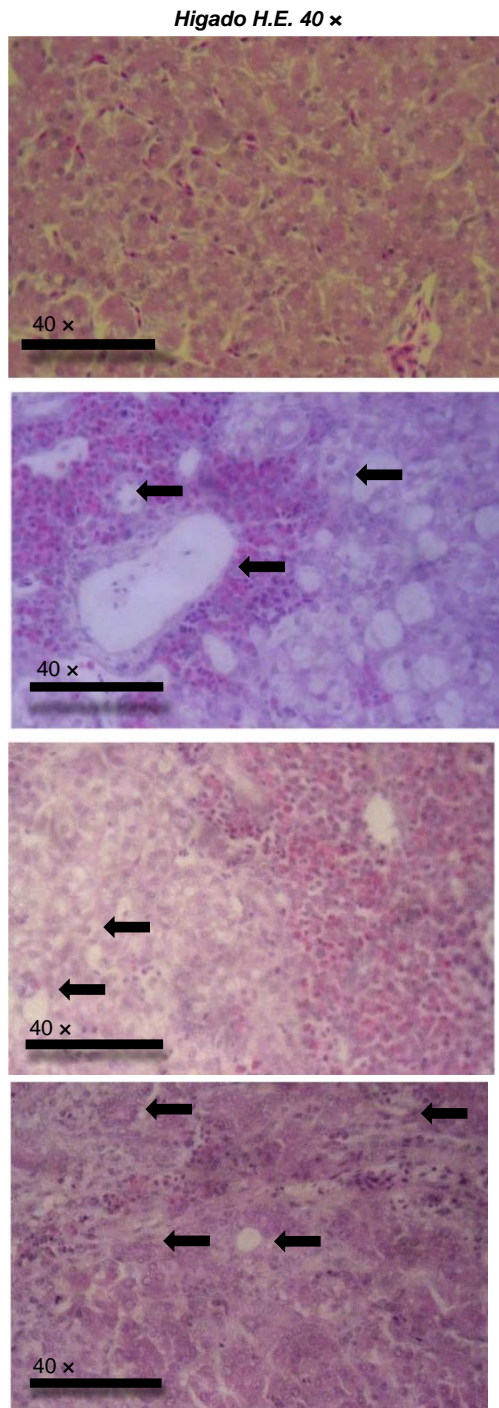
Se puede mencionar que los efectos macroscópicos en los tratamientos con aflatoxina B1 eran diferentes, primariamente los tratamientos AFLA presentaron en sus tejidos una apariencia más grande, estos se apreciaban con friabilidad moderada y una coloración hepática pálido-amarillenta. Además, se percibía que los bordes capsulares se encontraban redondeados, principalmente en el borde caudal. En otros órganos como son el bazo y la bolsa de Fabricio, las lesiones hemorrágicas aparecían de forma moderada, principalmente, en los tratamientos AFLA (**Figura 9**).

Las lesiones observadas en los tratamientos AFLA son:

- Esteatosis de gota delgada severa
- Proliferación conductos biliares de grado severo
- Congestión moderada
- Hemorragia moderada
- Inflamación aguda de grado moderada
- Procesos de fibroplasia moderados

En lo que respecta a las evaluaciones ópticas con tinción de Gram, los pollos desafiados con *S. Enteritidis* presentaron un incremento significativo en el conteo bacteriano en el hígado, mostrando valores de hasta 2381 ± 364 de cuenta relativa. En contraste con AFLA no existió un aumento de esta cuenta relativa (2548 ± 308) como se muestra en la **Figura 10**. Las evidencias ópticas fueron contrastadas contra el tratamiento CT.

Figura 9. Lesiones microscópicas hepáticas asociadas con la intoxicación con aflatoxina y la infección con *S. enteritidis* en pollos de engorda a los 21 días de edad.



TRATAMIENTO

CT

(a)

AFLA

(b)

SAL

(c)

AFLA+SAL

(d)

Hallazgos histológicos en tejidos hepáticos (40 x, tinción H&E). Control, pollos alimentados con una dieta libre de AFB₁; AF, pollos alimentados con una dieta contaminada con AFB₁; SE, pollos alimentados con una dieta libre de AFB₁ desafiados con 10⁸ UFC de *S. enteritidis* por ave a los 18 días de edad; AF + SE, pollos alimentados con una dieta contaminada con AFB₁ desafiados con 10⁸ UFC de *S. enteritidis* por ave a los 18 días de edad. La estructura normal en el grupo control (a). La esteatosis hepática severa, la proliferación masiva de los conductos biliares y la inflamación son claros en el grupo AF (b) y AF + SE (d). Mínima degeneración hepática e inflamación mínima en el grupo SE (c). Barra de escala = 100 μm.

6.6 Histología Hematoxilina & eosina

Adicionalmente de las lesiones macroscópicas en donde se observó un efecto importante en tamaño, las lesiones observadas bajo microscopia en los órganos blanco denotan una intoxicación crónica provocada por la aflatoxina, exhibiendo zonas degenerativas crónicas en diferentes fases de maduración, cambios vasculares relacionados de manera directa las frecuencias degenerativas, así como ligaduras de eventos inflamatorios agudos junto con la presencia de células inflamatorias abundantes en los tratamientos AFLA y SAL. El aumento de los conductos biliares se ha atribuido a toxicidad hepática (Jubb, Kennedy et al. 2012) en donde las principales menciones desde el punto de vista alimenticio están las aflatoxinas (**Tabla 13**)(Patil, Sharma et al. 2014).

6.7 Histología con tinción de Gram

En este trabajo, se evidenció que todas las secciones de hígado para los grupos SAL y AFLA + SAL eran positivas para bacterias mediante la técnica de tinción de Gram (**Figura 9**), lo que confirma la característica invasiva de la cepa bacteriana utilizada. Varios autores como (Ilan 2012, Grenier and Applegate 2013, Awad, Hess et al. 2017) coinciden en que un intestino estable tiene como función ser impermeable mientras la homeostasis así lo requiera, considerando la teoría base de metagenómica mencionada por (Nathanail, Varga et al. 2015) y (Riiser, Haverkamp et al. 2020) la cual menciona que puede existir un desbalance obligado por el intestino si los microbiomas lo requieren. Un ejemplo de este proceso de adaptación son los cambios súbitos en la secreción de moco considerando algunos efectos comunes en la mucosa intestinal, como son la deshidratación, periodos largos de ayuno y el estrés calórico, los cuales cambian fisiológicamente el microambiente intestinal como respuesta a este periodo adaptativo (Torrent, Arce Menocal et al. 2019).

En este experimento dosificando AFB₁ a 470 ng/g de alimento no tuvo ningún efecto adicional sobre el potencial invasivo de *S. enteritidis*, esto quizá por la dosis de *Salmonella* ya que algunos autores como (Burel, Tanguy et al. 2013), dosificaron en cinco ocasiones a lo largo de su desarrollo experimental, a diferencia del presente trabajo donde sólo se dosificó una única ocasión al día 18. En la literatura sobre exposición a patógenos se considera que la autoinfección o la dosificación continua acelera los procesos infecciosos provocando signos puntuales (Rojo Mediavilla 1984). Sin duda es que algunos patógenos han demostrado que *Salmonella sp.* interrumpe las uniones estrechas y la expresión de citocinas inflamatorias como TNF- α (Ebrahim, Kersten et al. 2014). En el

presente experimento los conteos de UFC utilizados por vía oral fueron de 1×10^8 de *Salmonella* y los resultados obtenidos demostraron haber traspasado al lecho vascular y alojarse en el hígado; sin embargo, no se observó diferencia significativa entre los grupos AFLA y los grupos SAL ($p > 0.05$).

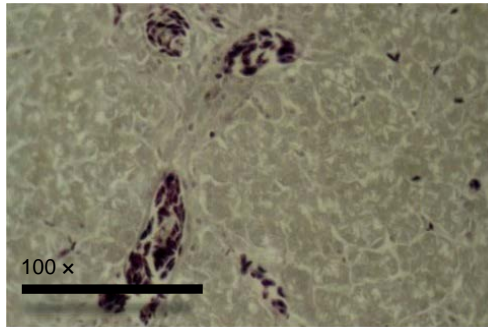
Figura 10. Lesiones microscópicas hepáticas y tinción de gram en tejidos asociadas con la intoxicación con aflatoxina y la infección con *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda a los 21 días de edad.

TRATAMIENTO

Hígado Gram 100 x

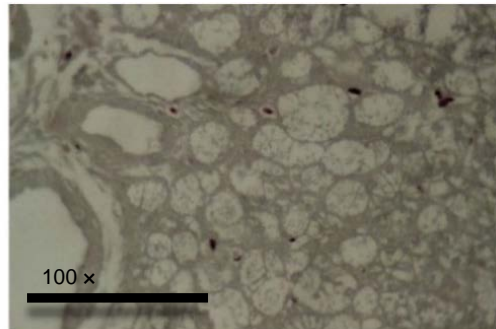
CT

(a)



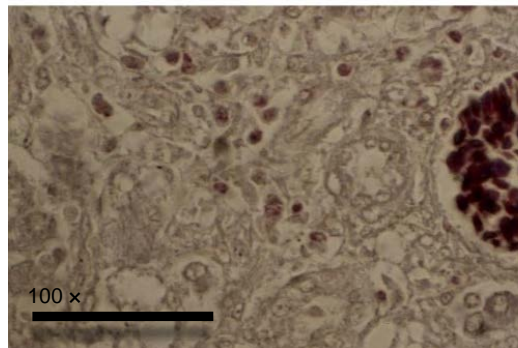
AFLA

(b)



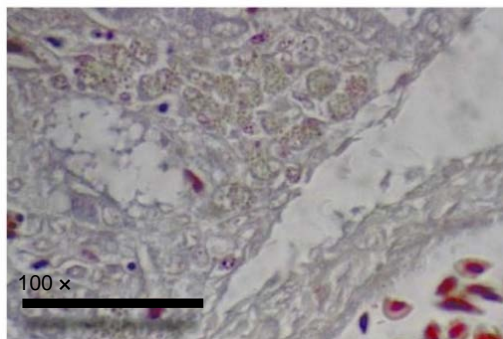
SAL

(c)



AFLA+SAL

(d)



Tejido hepático teñido con la técnica de Gram (100 x). (a) Control, pollos alimentados con una dieta libre de AFB₁; (b) AFLA, pollos alimentados con una dieta contaminada con AFB₁; (c) SAL, pollos alimentados con una dieta libre de AFB₁ y desafiados con 10⁸ UFC de *S. Enteritidis* por ave a los 18 días de edad; (d) AFLA + SAL, pollos alimentados con una dieta contaminada con AFB₁ desafiados con 10⁸ UFC de *S. Enteritidis* por ave a los 18 días de edad. Barra de escala = 50 μm.

Falta la descripción de los hallazgos.

Tabla 6. Lesiones microscópicas hepáticas asociadas con la intoxicación con aflatoxina y la infección con *S. enteritidis* en pollos de engorda a los 21 días de edad.

<i>Lesión</i>	<i>Tratamiento</i>			
	<i>CT</i>	<i>AFLA</i>	<i>SAL</i>	<i>AFLA + SAL</i>
Esteatosis hepática	0.8 _a	2.9 _b	0.8 _a	2.6 _b
Proliferación de conductos biliares	0.1 _a	3.0 _b	0.4 _a	2.9 _b
Congestión	0.5 _a	2.9 _a	0.7 _a	2.6 _a
Hemorragia	0.6 _a	2.8 _b	0.4 _a	2.8 _b
Inflamación	0.6 _a	2.9 _b	0.9 _a	2.9 _b
Fibrosis	1.0 _a	2.7 _b	1.0 _a	2.7 _b

Media de 5 repeticiones y 2 aves por tratamiento (n=10) ± error estándar. Literales diferentes dentro de la misma fila muestran diferencia estadística significativa (Prueba de Kruskal Wallis p <0.05).

6.8 Permeabilidad de FITC-D

Los datos obtenidos de los sueros con FITC-D, evidenciaron un incremento significativo en los tratamientos AFLA, los resultados demostraron que en estos tratamientos aumentó en 2.4 veces su fluorescencia. Por otra parte, el tratamiento SAL, no demostró valores superiores al tratamiento CT a pesar de haber tenido 1×10^8 UFC de la bacteria ($p > 0.05$).

Existen algunos biomarcadores de la permeabilidad que se pueden evaluar *in vivo* como lo es FITC-D, este, marcador de manera natural puede traspasar la barrera intestinal, en este caso al ser expuesta en los diferentes tratamientos mostró un aumento de hasta 2.4 veces más en el tratamiento AFLA en relación con el grupo CT. Estos datos puntualizan que el aumento en el paso del biomarcador hacia el compartimiento vascular, 1 hora después de dosificarlo por vía oral, se observó como resultado un aumento en la absorción en el intestino. Así mismo, en un ensayo en donde se dosificaron 1200 ng/g de AFB₁ en pollos de engorda, se ha mencionado que la respuesta del tejido intestinal a 21 días exhibe lesiones en las microvellosidades intestinales, disminución en el volumen celular, acortamiento y fusión de vellosidades, además de que la línea de observación de las proteínas de unión estrecha desaparece y forman aglomerados proteínicos desnaturalizados

(Tejada-Castaneda, Avila-Gonzalez et al. 2008). En un ensayo realizado en 2017, se expuso a aves con dietas contaminadas con *S. enteritidis* 1×10^8 UFC, a estas aves se les administro FITC-D (4.16 mg/Kg), dosis similar utilizada en este ensayo y después de la toma de muestras y la valoración de los resultados, para los tratamientos que contenían *Salmonella* (Tabla 16), éstos mostraron diferencia estadística significativa, aumentando la cantidad detectada de FITC-D en el suero de las aves con tratamiento con *Salmonella* en comparación con el tratamiento control hasta por 4.65 veces más; se debe considerar que la dosis de la bacteria administrada se utilizó más de 1 vez (Prado-Rebolledo, Delgado-Machuca et al. 2017).

La absorción intestinal de la AFB₁ puede lograrse mediante varias rutas:

1) La AFB₁ pueda pasar, ya sea a través del enterocito o bien atravesar íntacta la capa epitelial (transporte pasivo). El citocromo P450 convierte las moléculas en un epóxido, para así formar aductos con proteínas. Posteriormente, estas proteínas llegarán desde intestino a la cisterna de quilo para continuar así al hilio hepático. Finamente éstas serán distribuidas a través de las venas porta en el mismo espacio tisular, al tejido hepático o bien a otros tejidos. No queda muy claro pero hay una circulación enterohepática en el transcurso del metabolismo de AFB.

2) La segunda opción para la absorción de AFB₁, es la vía paracelular, ya que esta vía tratando de mantener la homeostasis intestinal, se puede ver afectada por la presencia de AFB₁, y que por su naturaleza lipofílica puede unirse a las TJ modificando su función y, a la par, la expresión de éstas. Este resultado puede dar un efecto indirecto provocado por la toxicidad de la AFB₁. Una vez que el intestino aumenta la permeabilidad, la pérdida de la homeostasis queda activa y la AFB₁ penetra al sistema vascular ya sea epoxidada o bien como metabolito íntegro sin catabolismo. De este modo pueden afectar de manera directa órganos como son el hígado y el riñón (Cesaro, Tiso et al. 2011).

En general, la presencia de AFB₁ en las dietas de pollos de engorda en el presente ensayo, demostraron que los resultados en lo referente a los índices productivos, los análisis serológicos, así como el peso relativo de órganos y la observación microscópica, presenta efectos negativos en los diferentes tratamientos con un contenido en la dieta de 470 ng/g de AFB₁.

En los resultados observados en un ensayo realizado por Chen y cols., 2016, en donde posterior a la dosificación de 1500 ng de AFB₁ /g en pollos engorda, se realizó una prueba de permeabilidad intestinal denominada doble-azúcar, en esa pruebas se utiliza la relación de dos azúcares “lactulosa:ramnosa” (L:R; 0.25 g/mL lactulosa y 0.05 g/mL L-rhamnosa, ambas disueltas en agua libre de nucleasas y proteasas) y observaron un incremento en la relación L:R en los tratamientos

donde existía AFB₁. Por otra parte, los autores evaluaron la expresión de algunas proteínas de unión estrecha en donde se encontró diferencia estadística en uno de sus tratamientos. Sin embargo, encontraron que la AFB₁ aumentó la expresión de ARNm de claudina 1 y 2 *in vivo*, aunque no se hizo cuantificación independiente para cada proteína. Al contrastar los resultados de Chen y colaboradores con el presente trabajo, ellos utilizaron una dosis de AFB₁ a 1.5 mg/Kg en yeyuno intermedio a diferencia del presente donde se utilizó 0.470 mg/Kg de la misma micotoxina en duodeno, lo que da como resultado cambios importantes en la permeabilidad intestinal (Chen, Naehrer et al. 2016). Por otra parte, la respuesta celular *in vitro* para demostrar la influencia por diferentes toxinas tales como AFB₁, ochratoxina A, fumonisina y deoxinivalenol ha sido evidenciada por diferentes autores, la mayoría coincide que la permeabilidad intestinal se ve afectada desde diferentes puntos de vista, aunque sólo en alguno de sus ensayos han tenido experimentos *in vivo* (Kasuga, Hara-Kudo et al. 1998, McLaughlin, Padfield et al. 2004, Sergeant, Parys et al. 2006, Pinton, Nougayrede et al. 2009, Romero, Ares et al. 2016).

Tabla 7. Efectos de la dieta contaminada con aflatoxinas y la infección por *S. enteritidis* en la detección FITC-D en suero de los pollos de engorda a los 21 días de edad.

	Tratamientos			
	CT	AFLA	SAL	AFLA+SAL
	µg/ml			
NIVEL	0.17 ± 0.01 ^a	0.49 ± 0.02 ^b	0.15 ± 0.01 ^a	0.47 ± 0.03 ^b

Media de 5 repeticiones y 3 aves por tratamiento (n=15) ± error estándar.

Literales diferentes dentro de la misma fila muestran diferencia estadística significativa (Prueba de Dunnett p<0.05).

7.0 CONCLUSIONES

7.1 Conclusión general

La administración de aflatoxina B₁ a una dosis de 470 ng/g de alimento afectó los parámetros productivos; peso vivo hasta por 160 g de diferencia al día 21 y aumentó el índice de conversión alimenticia hasta por 0.50 puntos por arriba del tratamiento control. La bioquímica sanguínea se afectó de forma negativa en las proteínas totales en 10.1 g/L por debajo del tratamiento control y hasta 3.1 g/L para albúmina, de forma similar para glucosa, globulina y colesterol, resaltando este último por su baja concentración de 60 mg/dL. Las enzima AST y la proporción AST:ALT también se observó con efectos negativos obteniendo niveles de 97.1 (U/L) acentuando el daño al tejido hepático. El hígado, riñón y bolsa cloacal (de Fabricio) aumentaron su tamaño en relación con el tratamiento control, siendo 2969, 657 y 77 mg/100 g de peso, respectivamente. Relacionado con este aumento de peso se adicionan efectos degenerativos principalmente en hígado, donde la frecuencia diagnóstica de esteatosis hepática, proliferación de conductos biliares, inflamación, moderada fibrosis y efectos vasculares se presentó de forma importante. Adicionalmente, los datos obtenidos en traslocación por salmonella demuestran la capacidad de la bacteria de movilizarse a hígado, sin embargo, no existieron resultados con diferencia estadística significativa. La presencia de aflatoxina B₁ y Salmonella enterica Serovar enteritidis, aumentó la permeabilidad del marcador isotiocianato de fluoresceína dextran (FITC-D) en las aves de engorda hasta 2.4 veces siendo mayor que en los tratamientos adjuntos, así mismo las lesiones por aflatoxinas se hicieron evidentes, la inmunidad detectada por IgA resulta disminuida por aflatoxina a los 21 días del ciclo productivo avícola.

7.2 Conclusiones particulares

7.2.1 Parámetros productivos

La presencia de AFB₁ a dosis moderadas de 470 ng/g de alimento afectó de manera negativa los índices productivos en lo referente a un aumento en el consumo de alimento semanal y acumulado, produciendo una disminución en la ganancia de peso y disminución en el peso promedio final además de aumentar la mortandad en el tratamiento AFLA y AFLA + SAL.

7.2.2 Bioquímica sanguínea

La dosis de 470 ng/g de AFB₁ en pollos de engorda a 21 días de edad promovió cambios negativos en la bioquímica sanguínea (proteínas totales, albúmina globulina, glucosa y colesterol), además evidenció la lesión hepática por los valores obtenidos en los analitos AST y ALT.

7.2.3 Peso de órganos

La suplementación con AFB₁ (470 ng/g) aumentó significativamente el peso (g) de los tejidos como son hígado, riñón y bolsa cloacal. Además, mostraron procesos inflamatorios crónicos como secuelas de la intoxicación por AFB₁. La bolsa cloacal en los tratamientos con AFLA y SAL mostraron pesos por arriba del tratamiento control esto denotando procesos inflamatorios presentes en el tejido hepático en donde el volumen celular aumentado genera más peso en el órgano.

7.2.4 Histología (Hematoxilina & Eosina)

La dosis de 470 ng/g de AFB₁ generó efectos negativos en los tejidos, (inflamatorios, degenerativos y hemodinámicos) mostrando efectos acumulativos durante un periodo de 21 en el tejido hepático.

7.2.5 Histología (Gram)

La presencia de bacterias cerca del espacio porta y considerando que aparece en los tratamientos con *S. enteritidis*, así como el conteo de éstas de forma digital una vez que fueron teñidas con gram, demuestran invasión, pero sin diferencia significativa $p < 0.05$.

7.2.6 FITC-D

La AFB₁ suministrada a los pollos de engorda a 21 días, generó un aumento de 0.32 mg/ml en la permeabilidad intestinal aumentando los niveles de detección de FITC-D en el suero recolectado 1h posterior a su dosificación para los tratamientos con AFB₁

7.2.7 IgA Intestinal

La IgA intestinal aumentó significativamente con la presencia de *S. enteritidis* en el lumen intestinal 1×10^8 en pollos de engorda 21d Y una respuesta menor en el tratamiento AFLA y SAL.

8.0 PERSPECTIVAS

Tomando como base los resultados obtenidos, se pretende hacer evaluaciones con otras toxinas de hongos y que afecta a las aves, así mismo evaluar estos ensayos con diferentes contenidos. En sumatoria a estos ensayos se pretende evaluar algunas proteínas importantes que involucran la salud intestinal proyectando la cuantificación de MUC-1, MUC-2, proteínas como lo es la claudina, ocludina y zona occludens 1, 2 y 3. Por otra parte, se pretende hacer a la par ensayos en donde se incluyan probióticos para evaluar el efecto en intestino de forma molecular.

9.0 REFERENCIAS

- Aijaz, S., M. S. Balda and K. Matter (2006). "Tight junctions: molecular architecture and function." International Review of Cytology **248**: 261-298.
- Akbari, P., S. Braber, S. Varasteh, A. Alizadeh, J. Garssen and J. Fink-Gremmels (2017). "The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins." Archives of Toxicology **91**(3): 1007-1029.
- Alassane-Kpembé, I., G. Schatzmayr, I. Taranu, D. Marin, O. Puel and I. P. Oswald (2017). "Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **57**(16): 3489-3507.
- Alexopoulos, H., A. Bottger, S. Fischer, A. Levin, A. Wolf, T. Fujisawa, S. Hayakawa, T. Gojobori, J. A. Davies, C. N. David and J. P. Bacon (2004). "Evolution of gap junctions: the missing link?" Current Biology **14**(20): R879-880.
- Alvarez Bañuelos, M. T., M. Carvajal Moreno, N. Ruisánchez Peón and F. Rojo (2000). "Aducto-ADN-aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado." Revista cubana de oncología: 35-39.
- Ando-Akatsuka, Y., M. Saitou, T. Hirase, M. Kishi, A. Sakakibara, M. Itoh, S. Yonemura, M. Furuse and S. Tsukita (1996). "Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues." J Cell Biol **133**(1): 43-47.
- Andretta, I., M. Kipper, C. Lehnen and P. Lovatto (2012). "Meta-analysis of the relationship of mycotoxins with biochemical and hematological parameters in broilers." Poultry science **91**(2): 376-382.
- Awad, W. A., C. Hess and M. Hess (2017). "Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens." Toxins **9**(2): 60.
- Baker, T. S., G. E. Sosinsky, D. L. Caspar, C. Gall and D. A. Goodenough (1985). "Gap junction structures. VII. Analysis of connexon images obtained with cationic and anionic negative stains." J Mol Biol **184**(1): 81-98.
- Balda, M. S. and K. Matter (2008). "Tight junctions at a glance." J Cell Sci **121**(Pt 22): 3677-3682.
- Balda, M. S. and K. Matter (2016). "Tight junctions as regulators of tissue remodelling." Curr Opin Cell Biol **42**: 94-101.
- Barnes, J. L., M. Zubair, K. John, M. C. Poirier and F. L. Martin (2018). "Carcinogens and DNA damage." Biochemical Society Transactions **46**(5): 1213-1224.
- Baxter, M. F., R. Merino-Guzman, J. D. Latorre, B. D. Mahaffey, Y. Yang, K. D. Teague, L. E. Graham, A. D. Wolfenden, X. Hernandez-Velasco and L. R. Bielke (2017). "Optimizing fluorescein isothiocyanate dextran measurement as a biomarker in a 24-h feed restriction model to induce gut permeability in broiler chickens." Frontiers in veterinary science **4**: 56.
- Bazzoni, G. (2003). "The JAM family of junctional adhesion molecules." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 525-530.
- Black, B. L. and J. O. Rogers (1992). "Development of Ca²⁺ homeostasis in epithelial cells from embryonic and neonatal intestine." Am J Physiol **263**(3 Pt 1): G371-379.
- Bondy, G. S. and J. J. Pestka (2000). "Immunomodulation by fungal toxins." Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews **3**(2): 109-143.
- Borradori, L. and A. Sonnenberg (1999). "Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes." J Invest Dermatol **112**(4): 411-418.
- Bouhet, S., E. Hourcade, N. Loiseau, A. Fikry, S. Martinez, M. Roselli, P. Galtier, E. Mengheri and I. P. Oswald (2004). "The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells." Toxicol Sci **77**(1): 165-171.

- Brase, S., A. Encinas, J. Keck and C. F. Nising (2009). "Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites." Chem Rev **109**(9): 3903-3990.
- Burel, C., M. Tanguy, P. Guerre, E. Boilletot, R. Cariolet, M. Queguiner, G. Postollec, P. Pinton, G. Salvat, I. P. Oswald and P. Fravallo (2013). "Effect of low dose of fumonisins on pig health: immune status, intestinal microbiota and sensitivity to Salmonella." Toxins (Basel) **5**(4): 841-864.
- Cajachagua Pucuhuaranga, C. L. (2018). "Elaboración de constructos genéticos para la expresión soluble de FimH de Salmonella enterica serovar Typhimurium."
- Camilleri, M. (2019). "Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans." Gut **68**(8): 1516-1526.
- Capaldo, C. T., A. E. Farkas and A. Nusrat (2014). "Epithelial adhesive junctions." F1000Prime Rep **6**: 1.
- Carvajal, M. (2013). "Transformación de la aflatoxina B 1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB 1-ADN." TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas **16**(2): 109-120.
- Castillo, A. d. C. G., L. H. P. Martínez and N. L. C. Apodaca (2008). "Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo." Veterinaria México **39**(1): 81-90.
- Celi, P., A. Cowieson, F. Fru-Nji, R. Steinert, A.-M. Klünter and V. Verlhac (2017). "Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production." Animal Feed Science and Technology **234**: 88-100.
- Cerejido, M., R. G. Contreras and L. Shoshani (2004). "Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans." Physiol Rev **84**(4): 1229-1262.
- Cervantes, G. G. A. and L. F. J. Cuevas (1996). "Identificación y cuantificación de hongos productores de micotoxinas en maíz destinado al consumo animal en la región de Tecalitlán, Jalisco."
- Cesaro, C., A. Tiso, A. Del Prete, R. Cariello, C. Tuccillo, G. Cotticelli, C. del Vecchio Blanco and C. Loguercio (2011). "Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases." Digestive and Liver Disease **43**(6): 431-438.
- Chang, P.-K., B. W. Horn and J. W. Dorner (2005). "Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates." Fungal Genetics and Biology **42**(11): 914-923.
- Chen, X., K. Naehrer and T. J. Applegate (2016). "Interactive effects of dietary protein concentration and aflatoxin B1 on performance, nutrient digestibility, and gut health in broiler chicks." Poult Sci **95**(6): 1312-1325.
- Coenen, A., A. Smit, L. Zhonghua and G. Van Luijtelar (2000). "Gas mixtures for anaesthesia and euthanasia in broiler chickens." World's Poultry Science Journal **56**(3): 226-234.
- Craven, S., N. Stern, E. Line, J. Bailey, N. Cox and P. Fedorka-Cray (2000). "Determination of the incidence of Salmonella spp., Campylobacter jejuni, and Clostridium perfringens in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings." Avian diseases: 715-720.
- De Oliveira, H. F., C. N. Souto, P. C. Martins, I. Di Castro and A. Mascarenhas (2018). "Mycotoxins in broiler production." Revista de Ciências Agroveterinárias **17**(2): 292-299.
- De Walle, J. V., T. Sergeant, N. Piront, O. Toussaint, Y. J. Schneider and Y. Larondelle (2010). "Deoxynivalenol affects in vitro intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis." Toxicol Appl Pharmacol **245**(3): 291-298.
- Deitch, E. A. (2012). "Gut-origin sepsis: evolution of a concept." Surgeon **10**(6): 350-356.
- Díaz, S. (2019). "Identificación de lesiones hepáticas y renales causadas a las gallinas de postura por el consumo crónico de aflatoxinas y su interacción con tres agentes quimioprotectores."
- Du, K., C. Wang, P. Liu, Y. Li and X. Ma (2017). "Effects of Dietary Mycotoxins on Gut Microbiome." Protein Pept Lett **24**(5): 397-405.

- Ebrahim, M., S. Kersten, H. Valenta, G. Breves and S. Danicke (2014). "Residues of deoxynivalenol (DON) and its metabolite de-epoxy-DON in eggs, plasma and bile of laying hens of different genetic backgrounds." Arch Anim Nutr **68**(5): 412-422.
- Estrada, M. A. J., J. A. M. Hernández and L. G. Soto (2010). "Enhancement of competitive exclusion by a defined probiotic on Salmonella enterica serovar Enteritidis colonization during rearing of Leghorn chicks." Veterinaria México **41**(1): 25-43.
- Estrada Salazar, G. I. and M. C. Ramírez Galeano (2019). "Micología general."
- Fanning, A. S., B. J. Jameson, L. A. Jesaitis and J. M. Anderson (1998). "The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton." J Biol Chem **273**(45): 29745-29753.
- Farquhar, M. G. and G. E. Palade (1963). "Junctional complexes in various epithelia." J Cell Biol **17**: 375-412.
- Fink, J. and B. K. Koo (2016). "Clonal Evolution of Stem Cells in the Gastrointestinal Tract." Adv Exp Med Biol **908**: 11-25.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiiragi, K. Fujimoto and S. Tsukita (1998). "Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin." J Cell Biol **141**(7): 1539-1550.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita and S. Tsukita (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." J Cell Biol **123**(6 Pt 2): 1777-1788.
- Galarza-Seeber, R., J. D. Latorre, L. R. Bielke, V. A. Kuttappan, A. D. Wolfenden, X. Hernandez-Velasco, R. Merino-Guzman, J. L. Vicente, A. Donoghue, D. Cross, B. M. Hargis and G. Tellez (2016). "Leaky Gut and Mycotoxins: Aflatoxin B1 Does Not Increase Gut Permeability in Broiler Chickens." Front Vet Sci **3**: 10.
- García Pastor, L. (2017). "Análisis genético y molecular del operon std de salmonella enterica."
- Ghareeb, K., W. A. Awad, J. Bohm and Q. Zebeli (2015). "Impacts of the feed contaminant deoxynivalenol on the intestine of monogastric animals: poultry and swine." J Appl Toxicol **35**(4): 327-337.
- Giambrone, J., U. Diener, N. Davis, V. Panangala and F. Hoerr (1985). "Effects of purified aflatoxin on broiler chickens." Poultry Science **64**(5): 852-858.
- Gimeno, A. and M. Martins (2000). "Residuos de micotoxinas en leche, huevos y tejidos comestibles de aves, cerdos y rumiantes (parte I)." Albéitar **37**: 44-46.
- Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2009). "Gap junctions." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(1): a002576.
- Gratz, S., Q. K. Wu, H. El-Nezami, R. O. Juvonen, H. Mykkanen and P. C. Turner (2007). "Lactobacillus rhamnosus strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 Cells." Appl Environ Microbiol **73**(12): 3958-3964.
- Grenier, B. and T. J. Applegate (2013). "Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals." Toxins (Basel) **5**(2): 396-430.
- Gross, A., L. A. P. Pack, G. M. Schacht, S. Kant, H. Ungewiss, M. Meir, N. Schlegel, C. Preisinger, P. Boor, N. Guldiken, C. A. Krusche, G. Sellge, C. Trautwein, J. Waschke, A. Heuser, R. E. Leube and P. Strnad (2018). "Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury." Mucosal Immunol **11**(6): 1630-1639.
- Guarner, F. and J. R. Malagelada (2003). "Gut flora in health and disease." Lancet **361**(9356): 512-519.
- Gumbiner, B. M. (1993). "Breaking through the tight junction barrier." J Cell Biol **123**(6 Pt 2): 1631-1633.

- Hernandez-Ramirez, J. O., M. J. Nava-Ramirez, R. Merino-Guzman, G. Tellez-Isaias, A. Vazquez-Duran and A. Mendez-Albores (2019). "The effect of moderate-dose aflatoxin B1 and Salmonella Enteritidis infection on intestinal permeability in broiler chickens." *Mycotoxin Res.*
- Herrera, B. Y. and R. L. Jabib (2015). "Salmonellosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular." *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* **16**(1): 1-19.
- Herrero Querol, L., S. Lorán Ayala and M. Herrera Sánchez (2012). "Puesta a punto y validación de un método de análisis de aflatoxinas en frutos secos y cereales." *Universidad de Zaragoza.*
- Hoffmann, C., S. Dollive, S. Grunberg, J. Chen, H. Li, G. D. Wu, J. D. Lewis and F. D. Bushman (2013). "Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents." *PLoS One* **8**(6): e66019.
- Hollander, D. and J. D. Kaunitz (2019). "The "Leaky Gut": Tight Junctions but Loose Associations?" *Dig Dis Sci.*
- Holmes, J. L., C. M. Van Itallie, J. E. Rasmussen and J. M. Anderson (2006). "Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns." *Gene Expr Patterns* **6**(6): 581-588.
- Holthofer, B., R. Windoffer, S. Troyanovsky and R. E. Leube (2007). "Structure and function of desmosomes." *Int Rev Cytol* **264**: 65-163.
- Hosseini, A., Y. Gürbüz and Year "Aflatoxins in poultry nutrition." *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi* **18**(4): 1-5.
- Houriet, J. L. (2007). "Guía práctica de enfermedades más comunes en aves de corral (ponedoras y pollos)." *Miscelánea-EEA Cerro Azul (Argentina).*
- Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t. and I. A. f. R. o. Cancer (2002). *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*, World Health Organization.
- Husáková, E., K. Bobíková and D. Stašová (2015). "Total IgA in spleen, bursa and intestine of chickens pretreated with *E. faecium* AL41 and challenged with Salmonella Enteritidis PT4." *Food and Agricultural Immunology* **26**(3): 366-370.
- Huseyin, C. E., P. W. O'Toole, P. D. Cotter and P. D. Scanlan (2017). "Forgotten fungi-the gut mycobiome in human health and disease." *FEMS Microbiol Rev* **41**(4): 479-511.
- Hüttner Queiroz, M. (2012). *Estudio de sistemas evolutivamente conservados de regulación coordinada de la expresión génica en bacterias*, Universitat de Barcelona.
- Ilan, Y. (2012). "Leaky gut and the liver: a role for bacterial translocation in nonalcoholic steatohepatitis." *World J Gastroenterol* **18**(21): 2609-2618.
- Jahanian, E., A. H. Mahdavi, S. Asgary, R. Jahanian and M. H. Tajadini (2019). "Effect of dietary supplementation of mannanoligosaccharides on hepatic gene expressions and humoral and cellular immune responses in aflatoxin-contaminated broiler chicks." *Prev Vet Med* **168**: 9-18.
- Jubb, K. V. F., P. C. Kennedy and N. Palmer (2012). *Pathology of domestic animals*, Academic press.
- Kasuga, F., Y. Hara-Kudo, N. Saito, S. Kumagai and Y. Sugita-Konishi (1998). "In vitro effect of deoxynivalenol on the differentiation of human colonic cell lines Caco-2 and T84." *Mycopathologia* **142**(3): 161-167.
- Keller, K. M., Á. A. de Oliveira, T. X. de Almeida, L. A. M. Keller, B. D. Queiroz, L. M. T. Nunes, L. R. Cavaglier and C. A. da Rocha Rosa (2012). "Efeito de parede celular de levedura sobre o desempenho produtivo de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B1." *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* **34**(2): 101-105.
- Kew, M. C. (2013). "Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma." *J Gastrointestin Liver Dis* **22**(3): 305-310.
- Kostrewa, D., M. Brockhaus, A. D'Arcy, G. E. Dale, P. Nelboeck, G. Schmid, F. Mueller, G. Bazzoni, E. Dejana, T. Bartfai, F. K. Winkler and M. Hennig (2001). "X-ray structure of junctional adhesion

- molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif." EMBO J **20**(16): 4391-4398.
- Kubota, K., M. Furuse, H. Sasaki, N. Sonoda, K. Fujita, A. Nagafuchi and S. Tsukita (1999). "Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions." Curr Biol **9**(18): 1035-1038.
- Kuczynski, J., C. L. Lauber, W. A. Walters, L. W. Parfrey, J. C. Clemente, D. Gevers and R. Knight (2011). "Experimental and analytical tools for studying the human microbiome." Nat Rev Genet **13**(1): 47-58.
- Kulanthaivel, L., P. Srinivasan, V. Shanmugam and B. M. Periyasamy (2012). "Therapeutic efficacy of kaempferol against AFB1 induced experimental hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation, antioxidants and biotransformation enzymes." Biomedicine & Preventive Nutrition **2**(4): 252-259.
- Lamus, M. P. C. (2013). "Utilización de lectinas en la inhibición de la adhesión de *Pasteurella multocida*." Revista de Medicina Veterinaria(25): 93-107.
- Lee, N., N. Rachaputi, G. Wright, S. Krosch, K. Norman, J. Anderson, S. Ambarwati, I. Retnowati, O. Dharmaputra and I. Kennedy (2005). "Validation of analytical parameters of a competitive direct ELISA for aflatoxin B1 in peanuts." Food and agricultural immunology **16**(2): 149-163.
- Lin, L., J. Zhang, P. Wang, Y. Wang and J. Chen (1998). "Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods." Journal of chromatography A **815**(1): 3-20.
- Liu, G., T. Yan, J. Wang, Z. Huang, X. Chen, G. Jia, C. Wu, H. Zhao, B. Xue, L. Xiao and J. Tang (2013). "Biological system responses to zearalenone mycotoxin exposure by integrated metabolomic studies." J Agric Food Chem **61**(46): 11212-11221.
- Marin, D. E., M. Motiu and I. Taranu (2015). "Food contaminant zearalenone and its metabolites affect cytokine synthesis and intestinal epithelial integrity of porcine cells." Toxins (Basel) **7**(6): 1979-1988.
- Marquez, M. C., G. B. Escorcía and J. D. Larrea (2019). "Mecanismos de Patogenicidad de *Escherichia Coli* y *Salmonella* SSP." Contactos, Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería(113): 5-17.
- Martínez, E. M., M. V. Badillo and F. F. Parra (2000). "Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz." Agrociencia **34**(4): 477-484.
- Maygua, L. and O. Humberto (2012). Evaluación de dos Métodos de Control de Hongos Toxigénicos y Biotoxinas Post-Diagnóstico en Alimentos Concentrados para Aves, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- McLaughlin, J., P. J. Padfield, J. P. Burt and C. A. O'Neill (2004). "Ochratoxin A increases permeability through tight junctions by removal of specific claudin isoforms." Am J Physiol Cell Physiol **287**(5): C1412-1417.
- Micucci, H. A. and E. Camps (1987). "Lectinas: Obtención, estructura química, propiedades y aplicaciones diagnósticas y farmacológicas."
- Mionetto Cabrera, A. C. (2017). "Hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas en silos de sorgo húmedo."
- Mirzaei, M. K. and C. F. Maurice (2017). "Ménage a trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages." Nat Rev Microbiol **15**(7): 397-408.
- Mitic, L. L. and J. M. Anderson (1998). "Molecular architecture of tight junctions." Annu Rev Physiol **60**: 121-142.
- Mohd-Redzwan, S., R. Jamaluddin, M. S. Abd-Mutalib and Z. Ahmad (2013). "A mini review on aflatoxin exposure in Malaysia: past, present and future." Front Microbiol **4**: 334.

- Monteiro, A. C., R. Sumagin, C. R. Rankin, G. Leoni, M. J. Mina, D. M. Reiter, T. Stehle, T. S. Dermody, S. A. Schaefer, R. A. Hall, A. Nusrat and C. A. Parkos (2013). "JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function." Mol Biol Cell **24**(18): 2849-2860.
- Morgavi, D. P., E. Rathahao-Paris, M. Popova, J. Boccard, K. F. Nielsen and H. Boudra (2015). "Rumen microbial communities influence metabolic phenotypes in lambs." Front Microbiol **6**: 1060.
- Motta, E. L. (2009). Estimación de la exposición a micotoxinas a través de dos técnicas: ocratoxina A en plasma y biodisponibilidad de fumonisina B1 en copos de maíz, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Nagpal, R. and H. Yadav (2017). "Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview." Ann Nutr Metab **71 Suppl 1**: 11-16.
- Nathanail, A. V., E. Varga, J. Meng-Reiterer, C. Bueschl, H. Michlmayr, A. Malachova, P. Fruhmann, M. Jestoi, K. Peltonen, G. Adam, M. Lemmens, R. Schuhmacher and F. Berthiller (2015). "Metabolism of the Fusarium Mycotoxins T-2 Toxin and HT-2 Toxin in Wheat." J Agric Food Chem **63**(35): 7862-7872.
- Nazarizadeh, H. and J. Pourreza (2019). "Evaluation of three mycotoxin binders to prevent the adverse effects of aflatoxin B1 in growing broilers." Journal of Applied Animal Research.
- Nekrasova, O. and K. J. Green (2013). "Desmosome assembly and dynamics." Trends Cell Biol **23**(11): 537-546.
- Odenwald, M. A. and J. R. Turner (2017). "The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target?" Nat Rev Gastroenterol Hepatol **14**(1): 9-21.
- Ostry, V., F. Malir, J. Toman and Y. Grosse (2017). "Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification." Mycotoxin research **33**(1): 65-73.
- Oswald, I., D. Marin, S. Bouhet, P. Pinton, I. Taranu and F. Accensi (2005). "Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals." Food additives and contaminants **22**(4): 354-360.
- Otta, K., E. Papp and B. Bagocsi (2000). "Determination of aflatoxins in food by overpressured-layer chromatography." Journal of Chromatography A **882**(1-2): 11-16.
- Patil, R. D., R. Sharma and R. K. Asrani (2014). "Mycotoxicosis and its control in poultry: A review." Journal of Poultry Science and Technology **2**(1): 1-10.
- Peng, X., S. Zhang, J. Fang, H. Cui, Z. Zuo and J. Deng (2014). "Protective roles of sodium selenite against aflatoxin B1-induced apoptosis of jejunum in broilers." Int J Environ Res Public Health **11**(12): 13130-13143.
- Perozo Marín, F., J. M. Ferrer, M. S. Alvarado Morillo, H. S. Rincón Reyes, Y. Mavarez and M. Gil (2003). "Valores hematológicos en pollos de engorde expuestos de forma continua a bajas dosis de aflatoxina B1 en el estado Zulia, Venezuela."
- Pestka, J. J. and G. S. Bondy (1994). "Mycotoxin-induced immunomodulation." Immunotoxicology and immunopharmacology: 163-182.
- Pinton, P., C. Braicu, J. P. Nougayrede, J. Laffitte, I. Taranu and I. P. Oswald (2010). "Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism." J Nutr **140**(11): 1956-1962.
- Pinton, P., F. Graziani, A. Pujol, C. Nicoletti, O. Paris, P. Ernouf, E. Di Pasquale, J. Perrier, I. P. Oswald and M. Maresca (2015). "Deoxynivalenol inhibits the expression by goblet cells of intestinal mucins through a PKR and MAP kinase dependent repression of the resistin-like molecule beta." Mol Nutr Food Res **59**(6): 1076-1087.
- Pinton, P., J. P. Nougayrede, J. C. Del Rio, C. Moreno, D. E. Marin, L. Ferrier, A. P. Bracarense, M. Kolf-Clauw and I. P. Oswald (2009). "The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression." Toxicol Appl Pharmacol **237**(1): 41-48.

- Polak-Charcon, S., J. Shoham and Y. Ben-Shaul (1980). "Tight junctions in epithelial cells of human fetal hindgut, normal colon, and colon adenocarcinoma." J Natl Cancer Inst **65**(1): 53-62.
- Prado-Rebolledo, O. F., J. d. J. Delgado-Machuca, R. J. Macedo-Barragan, L. J. Garcia-Márquez, J. E. Morales-Barrera, J. D. Latorre, X. Hernandez-Velasco and G. Tellez (2017). "Evaluation of a selected lactic acid bacteria-based probiotic on Salmonella enterica serovar Enteritidis colonization and intestinal permeability in broiler chickens." Avian pathology **46**(1): 90-94.
- Quezada, T., H. Cuellar, F. Jaramillo-Juarez, A. Valdivia and J. Reyes (2000). "Effects of aflatoxin B1 on the liver and kidney of broiler chickens during development." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **125**(3): 265-272.
- Quigley, E. M. (2016). "Leaky gut - concept or clinical entity?" Curr Opin Gastroenterol **32**(2): 74-79.
- Quintana, J. A. (1999). Avitecnia: Manejo de las aves domesticas mas comunes, Trillas.
- Quiroga Ardiles, J. (2009). "Fagoterapia preventiva como biocontrol de Salmonella enteritidis en gallinas de postura experimentalmente infectadas."
- Rajabi, M., M. Jones, M. Hubbard, G. Rodrick and A. C. Wright (2011). "Distribution and genetic diversity of Salmonella enterica in the Upper Suwannee River." International journal of microbiology **2011**.
- Raju, M., S. Rao, K. Radhika and M. Chawak (2005). "Dietary supplementation of Spirulina and its effects on broiler chicken exposed to aflatoxicosis." Indian Journal of Poultry Science **40**(1): 36-40.
- Riiser, E. S., T. H. A. Haverkamp, S. Varadharajan, O. Borgan, K. S. Jakobsen, S. Jentoft and B. Star (2020). "Metagenomic Shotgun Analyses Reveal Complex Patterns of Intra- and Interspecific Variation in the Intestinal Microbiomes of Codfishes." Appl Environ Microbiol **86**(6).
- Robertson, J. A., D. J. Teunisson and G. J. Boudreaux (1970). "Isolation and structure of a biologically reduced aflatoxin B1." J Agric Food Chem **18**(6): 1090-1091.
- Rodríguez Hernández, R. (2015). "Prevalencia y caracterización molecular de salmonella SPP, en granjas avícolas de postura comercial en el departamento del Tolima."
- Rojo Mediavilla, E. (1984). "Enfermedades de las aves." Curso de especialización en producción animal.
- Romero, A., I. Ares, E. Ramos, V. Castellano, M. Martinez, M. R. Martinez-Larranaga, A. Anadon and M. A. Martinez (2016). "Mycotoxins modify the barrier function of Caco-2 cells through differential gene expression of specific claudin isoforms: Protective effect of illite mineral clay." Toxicology **353-354**: 21-33.
- Rondón, A., L. Samaniego, R. Bocourt, S. Rodríguez, G. Milián, M. Ranilla, M. Laurencio and M. Pérez (2008). "AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE CEPAS DE Lactobacillus sp. PROCEDENTES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE POLLOS DE CEBA ISOLATION, IDENTIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE PROBIOTIC PROPERTIES OF Lactobacillus sp. STRAINS OBTAINED FROM THE GASTROINTESTINAL TRACT OF BROILERS." CYTA-Journal of Food **6**(1): 56-63.
- Rosenberg, E. and I. Zilber-Rosenberg (2019). "The Hologenome Concept of Evolution: Medical Implications." Rambam Maimonides Med J **10**(1).
- Ross-308, M. d. m. (2018). ENGORDE PARA LA LÍNEA ROSS 308, Marzo.
- Ruiz Flores, G., F. Constantino Casas, J. A. Quintana López, C. Cedillo Peláez and O. Urquiza Bravo (2008). "Patogenia de Salmonella Enteritidis FT 13a y Salmonella Enteritidis biovar Issatschenko en pollos de engorda." Veterinaria México **39**(2): 145-160.
- SADER-SIAP (2020). "Sistema de alimentación agroalimentaria y pesquera."
- SADER-SIAP (2021). "Escenario mensual de productos agroalimentarios" Dirección de Análisis Estratégico
- SAGARPA (2011). "Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México."

- Saitou, M., K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, H. Takano, T. Noda and S. Tsukita (1998). "Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions." J Cell Biol **141**(2): 397-408.
- Salem, R., N. El-Habashi, S. E. Fadl, O. A. Sakr and Z. I. Elbially (2018). "Effect of probiotic supplement on aflatoxicosis and gene expression in the liver of broiler chicken." Environmental toxicology and pharmacology **60**: 118-127.
- Salud-N.O.M., S. d. (2000). "PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-188-SSA1-2000, Bienes y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.
- ." Diario Oficial de la Federación.
- Sanderson, K. E. and S. Nair (2013). "Taxonomy and species concepts in the genus Salmonella." Salmonella in domestic animals **2**: 1-19.
- Santos Chona, O. M. (1999). "Importancia y Efectos de la Aflatoxina en los Seres Humanos." MedUNAB: 124-129.
- Sapkota, D., R. Islam and T. Upadhyaya (2006). "Dietary supplementation of Emblica officinalis for amelioration of experimental aflatoxicosis in commercial broilers." Animal Nutrition and Feed Technology **6**(1): 65-71.
- Schneeberger, E. E. and R. D. Lynch (1992). "Structure, function, and regulation of cellular tight junctions." Am J Physiol **262**(6 Pt 1): L647-661.
- Sergent, T., M. Parys, S. Garsou, L. Pussemier, Y. J. Schneider and Y. Larondelle (2006). "Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations." Toxicol Lett **164**(2): 167-176.
- Shivaprasad, H., J. Timoney, S. Morales, B. Lucio and R. Baker (1990). "Pathogenesis of Salmonella enteritidis infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses." Avian diseases: 548-557.
- Silva, G. and H. S. López (2012). "Genes involucrados en la patogénesis, persistencia y excreción de Salmonella en modelos animales." Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias **25**(1): 107-122.
- Simon, D. B., Y. Lu, K. A. Choate, H. Velazquez, E. Al-Sabban, M. Praga, G. Casari, A. Bettinelli, G. Colussi, J. Rodriguez-Soriano, D. McCredie, D. Milford, S. Sanjad and R. P. Lifton (1999). "Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption." Science **285**(5424): 103-106.
- Springler, A., S. Hessenberger, N. Reisinger, C. Kern, V. Nagl, G. Schatzmayr and E. Mayer (2017). "Deoxynivalenol and its metabolite deepoxy-deoxynivalenol: multi-parameter analysis for the evaluation of cytotoxicity and cellular effects." Mycotoxin Res **33**(1): 25-37.
- Springler, A., S. Hessenberger, G. Schatzmayr and E. Mayer (2016). "Early Activation of MAPK p44/42 Is Partially Involved in DON-Induced Disruption of the Intestinal Barrier Function and Tight Junction Network." Toxins (Basel) **8**(9).
- Staehein, L. A. (1974). "Structure and function of intercellular junctions." Int Rev Cytol **39**: 191-283.
- Stojanović-Radić, Z., M. Pejčić, N. Joković, M. Jakanović, M. Ivić, B. Šojić, S. Škaljac, P. Stojanović and T. Mihajilov-Krstev (2018). "Inhibition of Salmonella Enteritidis growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination." Food Control **90**: 332-343.
- Sumano López, H. S. and L. Ocampo Camberos (2006). "Farmacología veterinaria."
- Tanaka, T., A. Yoneda, S. Inoue, Y. Sugiura and Y. Ueno (2000). "Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry." Journal of chromatography A **882**(1-2): 23-28.

- Tejada-Castaneda, Z. I., E. Avila-Gonzalez, M. T. Casaubon-Huguenin, R. A. Cervantes-Olivares, C. Vasquez-Pelaez, E. M. Hernandez-Baumgarten and E. Moreno-Martinez (2008). "Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed." *Poult Sci* **87**(8): 1569-1576.
- Tessari, E. N. C., C. A. F. Oliveira, A. L. S. P. Cardoso, D. R. Ledoux and G. Rottinghaus (2006). "Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks." *Br Poult Sci* **47**(3): 357-364.
- Tessari, E. N. C., C. A. F. Oliveira, A. L. S. P. Cardoso, D. R. Ledoux and G. Rottinghaus (2006). "Parâmetros hematológicos de frangos de corte alimentados com ração contendo aflatoxina B1 e fumonisina B1." *Ciência Rural* **36**(3): 924-929.
- Torrent, J., J. Arce Menocal, C. Lopez Coello and E. Avila Gonzalez (2019). "Effects of functional oils on performance and carcass characteristics of broilers under two different temperature environments." *Poult Sci* **98**(11): 5855-5861.
- Tsukita, S. and M. Furuse (2000). "The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions." *Ann N Y Acad Sci* **915**: 129-135.
- Upadhaya, S. D., J. Y. Song, M. A. Park, J. K. Seo, L. Yang, C. H. Lee, K. J. Cho and J. K. Ha (2012). "Isolation, screening and identification of Swine gut microbiota with ochratoxin a biodegradation ability." *Asian-Australas J Anim Sci* **25**(1): 114-121.
- Van Immerseel, F., J. De Buck, F. Pasmans, P. Velge, E. Bottreau, V. Fievez, F. Haesebrouck and R. Ducatelle (2003). "Invasion of Salmonella enteritidis in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids." *International journal of food microbiology* **85**(3): 237-248.
- Wang, J.-S. and J. D. Groopman (1999). "DNA damage by mycotoxins." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**(1-2): 167-181.
- Wang, W., A. Zuidema, L. Te Molder, L. Nahidiazar, L. Hoekman, T. Schmidt, S. Coppola and A. Sonnenberg (2020). "Hemidesmosomes modulate force generation via focal adhesions." *J Cell Biol* **219**(2).
- Wright, M. S., D. M. Greene-McDowelle, H. J. Zeringue Jr, D. Bhatnagar and T. E. Cleveland (2000). "Effects of volatile aldehydes from Aspergillus-resistant varieties of corn on Aspergillus parasiticus growth and aflatoxin biosynthesis." *Toxicon* **38**(9): 1215-1223.
- Wu, Q., A. Jezkova, Z. Yuan, L. Pavlikova, V. Dohnal and K. Kuca (2009). "Biological degradation of aflatoxins." *Drug Metab Rev* **41**(1): 1-7.
- Yunus, A. W., K. Ghareeb, M. Twaruzek, J. Grajewski and J. Bohm (2012). "Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: effects on bird performance and response to common vaccines." *Poult Sci* **91**(4): 844-851.
- Zhang, J., N. Zheng, J. Liu, F. D. Li, S. L. Li and J. Q. Wang (2015). "Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells." *Food Chem Toxicol* **83**: 54-60.
- Zuidhof, M., D. Holm, R. Renema, M. Jalal and F. Robinson (2015). "Effects of broiler breeder management on pullet body weight and carcass uniformity." *Poultry Science* **94**(6): 1389-1397.

10.0 APÉNDICE



The effect of moderate-dose aflatoxin B₁ and *Salmonella* Enteritidis infection on intestinal permeability in broiler chickens

J. O. Hernández-Ramírez¹ · M. J. Nava-Ramírez¹ · R. Merino-Guzmán² · G. Téllez-Isaías³ · A. Vázquez-Durán¹ · A. Méndez-Albores¹

Received: 28 February 2019 / Revised: 25 June 2019 / Accepted: 4 July 2019

© Society for Mycotoxin (Research Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.) and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The effect of dietary aflatoxin B₁ (AFB₁) and *Salmonella* Enteritidis infection on intestinal permeability was investigated. Two hundred 1-day-old male Ross 308 broiler chickens were randomly divided into 4 treatments of 5 replicates each (10 birds per replicate), which were fed ad libitum for 3 weeks with the following treatments: control, chickens fed an AFB₁-free diet; AF, chickens fed an AFB₁-contaminated diet at 470 ng/g; SE, chickens fed an AFB₁-free diet and challenged with 10⁸ cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old; AF + SE, chickens fed an AFB₁-contaminated diet and challenged with 10⁸ cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old. At day 21 of age, chicks received an oral gavage dose of fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-dextran) to evaluate gastrointestinal leakage. Blood and intestinal samples were collected to evaluate serum biochemistry and total intestinal IgA secretion, respectively. Liver tissues were aseptically collected to assess bacterial invasiveness and for histomorphological studies. The results showed that chickens receiving AFB₁ presented a significant increment (up to 2.4-fold) in serum FITC-dextran concentration ($p < 0.05$). Nevertheless, *S. Enteritidis* infection had no additional effect on gastrointestinal leakage. Furthermore, the ingestion of AFB₁ had no impact on the invasive potential of *S. Enteritidis*. These results suggest that moderate-dose AFB₁ adversely affects intestinal barrier function resulting in increased gut permeability in broiler chickens.

Keywords Broilers · B-Aflatoxins · *Salmonella* Enteritidis · Intestinal permeability · Intestinal IgA

Introduction

Aflatoxins (AFs) are the most investigated assemblage of mycotoxins (del Pilar Monge et al. 2012); these toxins are synthesized by toxigenic species of fungi of the *Aspergillus* genus, among them *A. flavus* Link, *A. parasiticus* Speare, and *A. nomius* Kurtzman et al. (Asao et al. 1963; Feibelman et al. 1998). Four major toxins are produced by these fungi: aflatoxin B₁ (AFB₁), aflatoxin B₂ (AFB₂), aflatoxin G₁ (AFG₁),

and aflatoxin G₂ (AFG₂). AFB₁ is by far the most powerful hepatotoxic, carcinogenic, teratogenic, and mutagenic compound from natural origin; consequently, it has been classified the International Agency of Research on Cancer as a human Group 1 carcinogen (Ostry et al. 2017).

Mexican regulations established the maximum levels of AFs allowed in cereals intended for human and animal consumption. For total AFs, action levels are set to 20 ng/g, and when this content is exceeded, the cereal can only be utilized for animal feed. In this case, the maximum limit for poultry is 100 ng/g (NOM-188-SSA1-2002 n.d.). It is well known that AFB₁ is toxic to a wide range of animal species. In poultry, AFs cause extensive toxic effects resulting in millions of dollars in annual losses due to poor performance, immunosuppression, and many other adverse effects (Rawal et al. 2010). AFs are also able to compromise fundamental functions of the gastrointestinal tract, including loss of barrier function (Gratz et al. 2007; Chen et al. 2016). Disruption of the intestinal epithelial barrier results in a leaky gut, which contributes to bacterial translocation (Ilan 2012; Grenier and Applegate 2013). Similarly, several studies have proven that *Salmonella*

✉ A. Méndez-Albores
albores@unam.mx

¹ Unidad de Investigación Multidisciplinaria L14 (Alimentos, Micotoxinas, y Micotoxicosis), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 54714 Mexico City, State of Mexico, Mexico

² Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

³ Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701, USA

spp. induce disruption of tight junctions and leaky gut (Awad et al. 2017). Reports on the effects of AFB₁ on gut health in broiler chickens are very limited and contradictory (Tejada-Castaneda et al. 2008; Chen et al. 2016; Galarza-Seeber et al. 2016). Many of the discrepancies among the findings may be attributable to differences in avian species, gender, and age, as well as dose and time of aflatoxin exposure. Furthermore, in the abovementioned studies, animal responses were evaluated using higher doses of AFs, from 1000 to 2000 ng/g (up to 20 times of the upper legal limit in Mexico). So far, there have been no investigations focusing on intestinal permeability in broiler chickens fed moderate doses of AFB₁ and subsequently challenged with *S. Enteritidis*. Consequently, this research aimed to evaluate the effect of dietary AFB₁ and *S. Enteritidis* infection on intestinal permeability in broiler chickens.

Materials and methods

Animal ethics

Birds were managed as prescribed by the Internal Committee for Care and Use of Experimental Animals (CICUAE, from its abbreviation in Spanish) of the Postgraduate Program in Animal Production and Health Sciences of the National Autonomous University of Mexico. Ethical approval code: CICUAE-C17_2.

Fungal isolate and aflatoxin analysis

Aflatoxins were produced in maize according to the technique suggested by Méndez-Albores et al. (2005) using a highly toxigenic strain of *Aspergillus flavus* Link (UNIGRAS-1231, Culture Collection of the Grain and Seed Research Unit of the National Autonomous University of Mexico). This fungus has a high ability to synthesize AFB₁ (Hernández-Meléndez et al. 2018). AFs were analyzed following the recommendations of Jardon-Xicotencatl et al. (2015) using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with a Waters ACQUITY H-Class System which included a quaternary solvent manager, an ACQUITY UPLC BEH C18 phase reverse column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm), and an UPLC-optimized fluorescence detector (Waters, MA, USA). The limits of detection were 2.01 and 0.58 ng/kg for AFB₁ and AFB₂, respectively. The mean recovery for this methodology was 92% with a standard error of 1.2 and a coefficient variation value of 4.7%.

Preparation of the aflatoxin-contaminated diet

The aflatoxin-contaminated maize was milled (Molinos Pulvex, Mexico City, Mexico) using a hammer head and a 0.5-mm mesh screen to provide ground material. The ground

maize was mixed in a starter feed formulated to approximate the nutritional requirements of broiler chickens (Table 1) as recommended by the National Research Council (NRC 1994). Levels of AFs (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂), T-2 toxin/HT-2 toxin, total fumonisins (FB₁, FB₂, and FB₃), and deoxynivalenol (DON) were determined in the feed using monoclonal antibody-based affinity columns and subsequent analysis by UPLC with fluorescence or photodiode array detection. No antibiotic nor anticoccidial drugs, or even growth promoters, were added to the diet. Feed batches (15 kg) were artificially contaminated with AFB₁ (470 ng/g) using 36 g of the aflatoxin-contaminated milled maize per kilogram of feed. In order to assure the proper distribution of the AFs, feed was mixed for 15 min in a Ribbon Blender Mixer model MH-7050 (Molinos Pulvex, Mexico City, Mexico). The control feed was also conditioned with 3.6% of aflatoxin-free maize.

Experimental birds and housing

Two hundred 1-day-old male Ross 308 broiler chicks (obtained from a commercial hatchery) were individually weighted and randomly distributed in four pens at the Poultry Research Station of the National Autonomous University of Mexico. Five replicates of 10 birds ($n = 50$ per treatment) were grouped

Table 1 Ingredient composition of the experimental diet

Ingredient	g/kg
Maize	574.5
Soybean meal	346.6
Vegetable oil	34.5
Dicalcium phosphate	18.6
Calcium carbonate	9.9
Salt	3.8
DL-Methionine	3.3
L-Lysine HCl	3.1
Threonine	1.2
Choline chloride 60%	2.0
Vitamin premix ¹	1.0
Mineral premix ²	1.0
Antioxidant ³	0.5
Metabolizable energy (MJ/kg)	12.7
Crude protein	221.5

¹ Vitamin premix supplied the following per kg: vitamin A, 20,000,000 IU; vitamin D3, 6,000,000 IU; vitamin E, 75,000 IU; vitamin K3, 9 mg; thiamine, 3 mg; riboflavin, 8 mg; pantothenic acid, 18 mg; niacin, 60 mg; pyridoxine, 5 mg; folic acid, 2 mg; biotin, 0.2 mg; cyanocobalamin, 16 mg; and ascorbic acid, 200 mg

² Mineral premix supplied the following per kg: manganese, 120 mg; zinc, 100 mg; iron, 120 mg; copper, 10–15 mg; iodine, 0.7 mg; selenium, 0.4 mg; and cobalt, 0.2 mg

³ Ethoxyquin

based on the following four dietary treatments: control, chickens fed an AFB₁-free diet; AF, chickens fed an AFB₁-contaminated diet; SE, chickens fed an AFB₁-free diet challenged with 10⁸ cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old; AF + SE, chickens fed an AFB₁-contaminated diet challenged with 10⁸ cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old. The temperature, lighting, and ventilation programs were followed according to standard recommendations of the supplier. Feed and water were provided ad libitum during the whole period of the experiment (21 days).

Bacterial challenge strain and experimental infection

The *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strain kindly supplied by the USDA National Veterinary Services Laboratory (Ames, IA, USA) was used. A spontaneous nalidixic acid (20 µg/mL) and novobiocin (25 µg/mL)-resistant mutant of this strain was used for challenge purposes. Briefly, 100 µL of *S. Enteritidis* from a frozen aliquot was added to 10 mL of tryptic soy broth, incubated at 37 °C for 8 h, and passed 3 consecutive times every 8 h to ensure that all of the bacteria were in log phase. Subsequently, bacterial cells were washed 3 times with sterile 0.9% saline by centrifugation at 1864×g for 10 min, reconstituted in saline, quantified spectrophotometrically, and diluted to 1 × 10⁸ cfu/mL. Chickens were orally challenged with 10⁸ cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old.

Collection of samples and measurements

Broilers were weighed individually on a weekly basis, feed consumption for each replicate was also measured weekly, and mortality was recorded as it occurred. Feed intake and feed conversion ratio were adjusted for mortalities when necessary. At 21 days of age, blood was drawn by cardiac puncture under anesthesia (chicks were exposed for 1 min to 40% carbon dioxide, 30% oxygen, and 30% nitrogen) from 15 randomly selected birds from each treatment (3 chickens per replicate), and serum prepared. The following analyses were performed spectrophotometrically using commercially available kits (BioSystems, Barcelona, Spain): total protein, albumin, glucose, and cholesterol. The serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities were also determined spectrophotometrically. The bled chickens were then exposed to 80% carbon dioxide, 5% oxygen, and 15% nitrogen for euthanasia (Coenen et al. 2000). Liver, kidney, spleen, and bursa of Fabricius were excised and washed in cold saline and their relative weight (mg/100 g body weight) determined. For histopathological studies, liver specimens were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 48 h, routinely embedded in paraffin, cut into 4-µm thick sections, and processed for hematoxylin and eosin (H&E) staining. Histopathological evaluation was accomplished in a

double-blind study and the severity of lesions were scored from 0 (no lesions) to 3 (most severe). Additionally, the Gram staining technique was used to study bacterial invasion. For this purpose, the red-stained bacteria (Gram-) were computed from digital images taken with a × 100 objective using ImageJ 1.52 version software (U. S. National Institutes of Health). A minimum of 25 digital images per treatment were considered.

Total intestinal immunoglobulin A levels

Total intestinal immunoglobulin A (IgA) levels were determined in gut rinse samples as described by Merino-Guzmán et al. (2017). Briefly, an intestinal section of 5 cm distal to Meckel's diverticulum was collected and rinsed 3 times with 5 mL (0.9%) saline; then, the rinse was centrifuged at 1864×g at 4 °C for 10 min and the supernatant collected. A commercial indirect ELISA kit was used to quantify IgA according to the manufacturer's instructions (Bethyl Laboratories Inc., TX, USA). Samples were measured at 450 nm using an ELISA plate reader (BioTek Instruments Inc., VT, USA).

Serum determination of fluorescein isothiocyanate dextran leakage

Fluorescein isothiocyanate dextran with molecular weight of 3–5 kDa (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used as a marker of paracellular transport and mucosal barrier dysfunction (Vicuña et al. 2015). Following the recommendation of Baxter et al. (2017), 1 h before the chicks were euthanized, 15 chicks of each group (3 per replicate) were given an oral gavage dose of 8.32 mg fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-dextran) per kilogram. The concentration of FITC-dextran was determined using a fluorescence LS-55 spectrophotometer (Perkin Elmer, MA, USA). Spectra were acquired in the 350–600-nm range using a 96-well plate reader accessory. The fluorescence emission spectra were collected at an excitation wavelength of 365 nm. FITC-dextran concentration was calculated using a standard reference with a calibration curve.

Experimental design and statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) as a 2 × 2 factorial using the general linear model (GLM) procedure in Statistical Analysis System software version 8.0 (SAS 2002), and means were separated by the Dunnett procedure and judged to be significantly different if $p < 0.05$. The Kruskal–Wallis nonparametric test was performed to assess the histopathological analysis with a level of significance set at $p < 0.05$.

Results

Analysis of dietary aflatoxins

The analysis of the artificially contaminated feed by UPLC indicates the presence of AFB₁ (470 ± 27 ng/g) and AFB₂ (30 ± 4 ng/g). In this work, the presence of AFB₂ was considered to be negligible, since this toxin is approximately 200-fold less toxic than AFB₁ (Méndez-Albores et al. 2005). The control diet had no detectable levels of AFs, T-2 toxin/HT-2 toxin, and total fumonisins. Assayed contents of these toxins were below the detection limits of the immunoaffinity column techniques employed (AFs < 1 ng/g, T-2 toxin/HT-2 toxin < 100 ng/g, total fumonisins < 0.016 mg/kg). DON was present at a level of 0.05 mg/kg.

Performance parameters

Data on performance parameters are summarized in Table 2. At the end of week 1 (7 days old), there were no significant differences in weight gain (WG) among the four treatment groups. However, by the end of week 2 (14 days old), WG was significantly reduced ($p < 0.05$) in chickens of the AF and AF + SE groups when compared with the control and SE groups, respectively. By the end of week 3, chickens receiving the AFB₁-contaminated diets have 31.4% and 29.6% reductions in WG, respectively. Similarly, by the end of weeks 2 and 3, feed conversion (FC) was significantly affected in the aflatoxin treatments. The observed mortality during the 21-day period was as follows: 8 chickens in the AF group, 10 chickens in the AF + SE group, and 0 mortalities in the control and SE groups, respectively. Although there was no statistically significant effect on performance parameters in chickens challenged with *S. Enteritidis*, a slight reduction (2.5%) in WG was observed during the last week (Table 2). It is important to note that *S. Enteritidis* infection had the only effect during 3 days of the last treatment week.

Plasma biochemistry and intestinal IgA levels

The results of the effects of dietary aflatoxins and *S. Enteritidis* infection on plasma biochemistry and total intestinal IgA levels in broiler chickens at 21 days are summarized in Table 3. Significant differences in plasma concentrations of total protein, albumin, globulin, glucose, and cholesterol were observed between birds fed control and AFB₁-contaminated diets. In general, AFs caused a significant decrease in plasma biochemistry profiles among the different dietary groups. Clear indications of aflatoxin toxicity were detected in chickens of the AF and AF + SE groups by the serum aspartate aminotransferase (AST) activity level, which increased by 1.8-fold in comparison with the control group. Furthermore, the ratio of AST:ALT increased 1.7 times in chickens fed with

the AFB₁-contaminated feed as compared with the control group. Infection by *S. Enteritidis* did not cause alterations in the plasma biochemistry profile of the SE and AF + SE groups. Moreover, no significant differences in the total intestinal IgA levels were observed among the AF, AF + SE, and control groups. However, a significant increment in the total intestinal IgA level was detected in the SE group, showing values up to 9394 ng/mL (Table 3).

Relative organ weight

Table 4 shows the effects of dietary aflatoxins and *S. Enteritidis* infection on relative organ weight (mg/100 g body weight) in broiler chickens at 21 days. When compared with the control group, relative weights of the liver and kidney increased significantly in chickens fed with the AFB₁-contaminated diets. Moreover, no significant differences were noted among all treatments in the spleen relative weight. However, when compared with the control group, the relative weight of the bursa of Fabricius increased up to 2.3-fold, in chickens of the AF, SE, and AF + SE groups. Table 4 also shows the bursa of Fabricius:spleen ratio; the AF and AF + SE groups reached the highest values. Chickens challenged with *S. Enteritidis* also showed a slightly larger bursa of Fabricius:spleen ratio (but not significantly) when compared with the control group (Table 4).

Macroscopic findings, histopathology, and bacterial invasiveness

At the end of the trial, the major gross lesions were observed in the liver of chickens fed with the AFB₁-contaminated diets. In general, livers of the AF and AF + SE groups were yellowish, friable, and appeared much larger in size compared with those of the control and SE groups, respectively. These lesions were also accompanied by hemorrhagic streaks. Furthermore, histopathological studies confirmed extensive liver damage; lesions observed were hepatic steatosis, massive bile duct proliferation, congestion, hemorrhage, inflammation, and fibrosis (Fig. 1, profiles b and d). In contrast, only a minimal degree of hepatic degeneration and minimal inflammation was seen in the livers of the SE group (Fig. 1, profile c). Infection by *S. Enteritidis* did not cause additional alterations in liver histology of the AF + SE group (Fig. 1, profile d). Primary lesions in the liver that showed significant differences at 21 days are summarized in Table 5. Furthermore, no bacteria were seen in the Gram-stained liver tissue sections of the control and AF groups (Fig. 2, profiles a and b). However, chickens challenged with *S. Enteritidis* presented a significant increment in bacterial invasion of the liver, showing values up to 2381 ± 364 relative counts (Fig. 2, profile c). No increase in bacterial invasion related to AFB₁ intake was observed (2548 ± 308 relative counts).

Table 2 Effects of dietary aflatoxins and *Salmonella* Enteritidis infection on weight gain, feed conversion, and mortality rate in broiler chickens at 21 days

Item	Treatments			
	Control	AF	SE	AF + SE
Weight gain (g)				
1 to 7 days old	104.5 ± 1.7 ^a	94.7 ± 1.7 ^a	103.0 ± 4.8 ^a	96.0 ± 2.3 ^a
7 to 14 days old	206.6 ± 5.0 ^a	129.1 ± 5.3 ^b	216.7 ± 4.8 ^a	126.3 ± 7.0 ^b
14 to 21 days old	257.0 ± 12.2 ^a	178.1 ± 11.6 ^b	251.9 ± 7.7 ^a	190.3 ± 12.5 ^b
1 to 21 days old	568.1 ^a	401.9 ^b	571.6 ^a	412.6 ^b
Deviation from control (%)	0	-31.4	-2.5	-29.6
FC (feed:gain)				
1 to 7 days old	1.12 ^a	1.10 ^a	1.18 ^a	1.15 ^a
7 to 14 days old	1.23 ^a	1.64 ^b	1.26 ^a	1.60 ^b
14 to 21 days old	1.28 ^a	1.80 ^b	1.31 ^a	1.81 ^b
MR (%)	0 ^a	8 ^b	0 ^a	10 ^b

Mean of five replicates of ten chicks each per treatment (minus mortality) ± standard error

Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Dunnett test $p < 0.05$)

FC feed conversion, MR mortality rate

FITC-dextran leakage

There were no differences in serum levels of FITC-dextran between control and *S. Enteritidis*-challenged chickens ($0.17 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ serum vs. $0.15 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ serum). However, a significant increment (2.4-fold) in serum FITC-dextran concentration was detected in chickens fed the AFB₁-contaminated diets. In those birds, the serum FITC-dextran concentration reached values up to $0.49 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ serum. *S. Enteritidis* infection had no additional effect on gastrointestinal leakage ($0.47 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ serum).

Discussion

The starter feed was mixed with the aflatoxin-contaminated maize to produce significant toxicity to broiler chickens. The

feed also contained T-2 toxin/HT-2 toxin, fumonisins, and DON at levels that were not as toxic as the AFB₁ content ($470 \pm 27 \text{ ng/g}$); consequently, these mycotoxins should have a negligible effect on chicks. Several previous reports have indicated that contents $> 75 \text{ mg FB}_1/\text{kg}$, $> 4 \text{ mg T-2 toxin/kg}$, and $> 16 \text{ mg DON/kg}$ are necessary to induce significant toxicity in young broiler chickens (Weibking et al. 1993; Kubena et al. 1989).

During the 21-day period, significant alterations in body weight gain, feed conversion, mortality, blood biochemistry, relative weights of the liver, kidney, bursa of Fabricius, and liver histology were observed due to the addition of AFB₁ to the diet. These findings are in close agreement with the results found by Raju et al. (2005) and Sapkota et al. (2006), who reported that an experimental diet containing $300 \text{ ng AFB}_1/\text{g}$ feed produced adverse effects on body weight gain, feed intake, and serum concentrations of proteins and cholesterol in

Table 3 Effects of dietary aflatoxins and *Salmonella* Enteritidis infection on plasma biochemistry and total intestinal IgA levels in broiler chickens at 21 days

Constituent	Treatment			
	Control	AF	SE	AF + SE
Total protein (g/L)	29.4 ± 0.4 ^a	18.8 ± 0.3 ^b	28.0 ± 0.9 ^a	19.1 ± 0.4 ^b
Albumin (g/L)	11.7 ± 0.6 ^a	8.6 ± 0.2 ^b	11.9 ± 0.4 ^a	8.2 ± 0.3 ^b
Globulin (g/L)	17.7 ± 0.3 ^a	10.2 ± 1.0 ^b	16.1 ± 0.5 ^a	10.9 ± 0.4 ^b
Glucose (mg/dL)	418.8 ± 5.5 ^a	318.1 ± 7.1 ^b	408.5 ± 3.1 ^a	317.7 ± 8.8 ^b
Cholesterol (mg/dL)	147.1 ± 2.5 ^a	87.0 ± 1.3 ^b	135.6 ± 1.1 ^a	86.6 ± 1.9 ^b
AST (U/L)	128.7 ± 3.0 ^a	225.8 ± 1.3 ^b	115.7 ± 1.9 ^a	233.4 ± 5.0 ^b
ALT (U/L)	18.2 ± 0.9 ^a	18.3 ± 0.5 ^a	18.3 ± 0.5 ^a	18.6 ± 0.4 ^a
AST:ALT ratio	7.1 ^a	12.3 ^b	6.3 ^a	12.5 ^b
Intestinal IgA (ng/mL)	5770 ± 799 ^a	6623 ± 866 ^a	9394 ± 616 ^b	7857 ± 291 ^a

Mean of five replicates of three chicks each per treatment ($n = 15$) ± standard error

Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Dunnett test $p < 0.05$)

Table 4 Effects of dietary aflatoxins and *Salmonella* Enteritidis infection on relative organ weights (mg/100 g body weight) in broiler chickens at 21 days

Organ	(mg/100 g body weight)			
	Control	AF	SE	AF + SE
Liver	3154 ± 160 ^a	6123 ± 254 ^b	3333 ± 136 ^a	5318 ± 286 ^b
Kidney	889 ± 58 ^a	1546 ± 134 ^b	858 ± 44 ^a	1654 ± 149 ^b
Spleen (S)	154 ± 19 ^a	153 ± 24 ^a	164 ± 20 ^a	185 ± 37 ^a
Bursa of Fabricius (B)	86 ± 18 ^a	163 ± 29 ^b	139 ± 43 ^b	199 ± 38 ^b
B:S ratio	0.6 ^a	1.1 ^b	0.8 ^a	1.1 ^b

Mean of five replicates of three chicks each per treatment ($n = 15$) ± standard error

Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Dunnett test $p < 0.05$)

broiler chickens. In general, the results obtained in this research in relation to performance (Table 2), serologic analysis (Table 3), relative organ weight (Table 4), and histopathology (Fig. 1, Table 5) indicate that these deleterious effects were caused by dietary AFB₁.

In this experiment, AFs (470 ng AFB₁/g feed) were able to induce significant effects on intestinal permeability, since birds receiving AFB₁ presented a substantial increment (up to 2.4-fold) in serum FITC-dextran concentration. Our results

are consistent with two previous in vivo studies using higher doses of AFB₁ (up to 1500 ng AFB₁/g feed). Tejada-Castaneda et al. (2008) in a 3-week study, where Ross 308 broiler chickens were fed a diet with 1200 ng AFB₁/g feed, reported that microvilli were uniformly affected by dietary AFs. Scanning electron microscopy investigations showed that microvilli were shorter and combined, the tight junction completely disappeared, and only irregular masses of denatured proteins were observed in the duodenum,

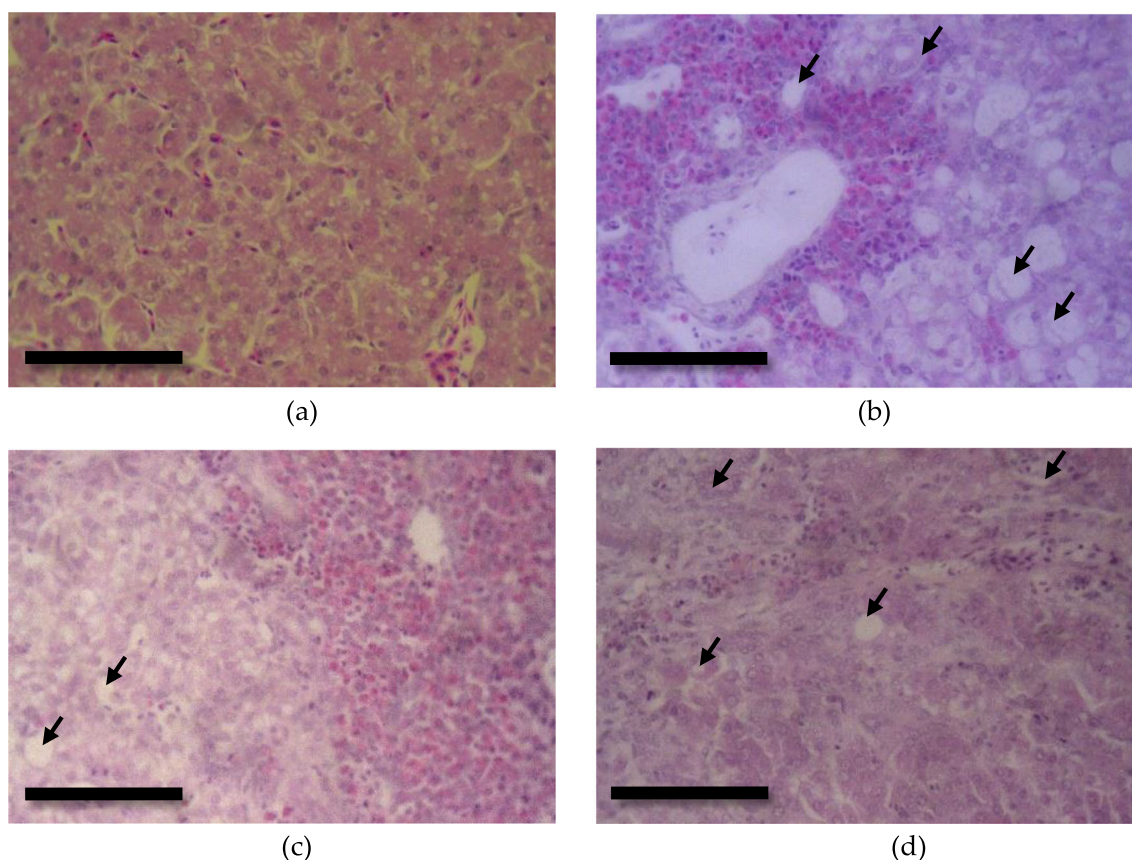


Fig. 1 Histological findings in liver tissues ($\times 40$, H&E stain). Control, chickens fed an AFB₁-free diet; AF, chickens fed an AFB₁-contaminated diet; SE, chickens fed an AFB₁-free diet challenged with 10^8 cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old; AF + SE, chickens fed an AFB₁-contaminated diet challenged with 10^8 cfu of *S. Enteritidis* per bird at

18 days old. The normal structure in the control group (profile a). Severe hepatic steatosis, massive bile duct proliferation, and inflammation are clear in the AF (profile b) and AF + SE (profile d) groups. Minimal hepatic degeneration and minimal inflammation in the SE group (profile c). Scale bar = 100 μ m

Table 5 Hepatic microscopic lesions associated with aflatoxin intoxication and *Salmonella* Enteritidis infection in broiler chickens at 21 days

Lesion	Treatment			
	Control	AF	SE	AF + SE
Hepatic steatosis	0.8 ^a	2.9 ^b	0.8 ^a	2.6 ^b
Bile duct proliferation	0.1 ^a	3.0 ^b	0.4 ^a	2.9 ^b
Congestion	0.5 ^a	2.9 ^a	0.7 ^a	2.6 ^a
Hemorrhage	0.6 ^a	2.8 ^b	0.4 ^a	2.8 ^b
Inflammation	0.6 ^a	2.9 ^b	0.9 ^a	2.9 ^b
Fibrosis	1.0 ^a	2.7 ^b	1.0 ^a	2.7 ^b

Mean of five replicates of two chicks each per treatment ($n = 10$)

Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Kruskal-Wallis test $p < 0.05$)

jejunum, and ileum sections. The authors concluded that AFs induce loss of epithelial polarity. Chen et al. (2016) determined the impact of 1500 ng AFB₁/g feed on gut health in Ross 708 broiler chickens. On day 20, using the dual-sugar gut permeability test, authors found significant increments in the serum lactulose:rhamnose ratio indicating impaired intestinal barrier of chickens that were fed AFB₁-contaminated

diet. Conversely, Galarza-Seeber et al. (2016) evaluated the effect of 1000, 1500, and 2000 ng AFB₁/g feed on gastrointestinal leakage in Cobb-Vantress broiler chickens. Authors reported that AFB₁ did not increase gut leakage as evidenced by the lack of increase in permeability of FITC-dextran in the serum. The researchers concluded that the integrity of gut epithelial barrier was not compromised after exposure to the three different AFB₁ contents.

Several in vitro studies also showed that exposure of human colon carcinoma cells (Caco-2) to mycotoxins such as AFB₁, FB₁, ochratoxin A (OTA), T2-toxin (T-2), and DON resulted in impaired intestinal barrier (Kasuga et al. 1998; McLaughlin et al. 2004; Sergent et al. 2006; Gratz et al. 2007; Pinton et al. 2009; Romero et al. 2016). Impaired gut epithelial integrity—due to alterations in tight junction proteins—may also be the pathological mechanism underlying bacterial translocation (Ilan 2012; Seki and Schnabl 2012). In this work, all of the liver sections from the SE and AF + SE groups were found to be positive for bacteria by the Gram staining technique (Fig. 2), confirming the invasive feature of the used bacterial strain. However, AFB₁ (470 ng/g feed) had no additional effect on the invasive potential of *S. Enteritidis*. Our results are in accordance with those of Burel et al. (2013), who reported that 8.6 mg FB₁/kg feed had no

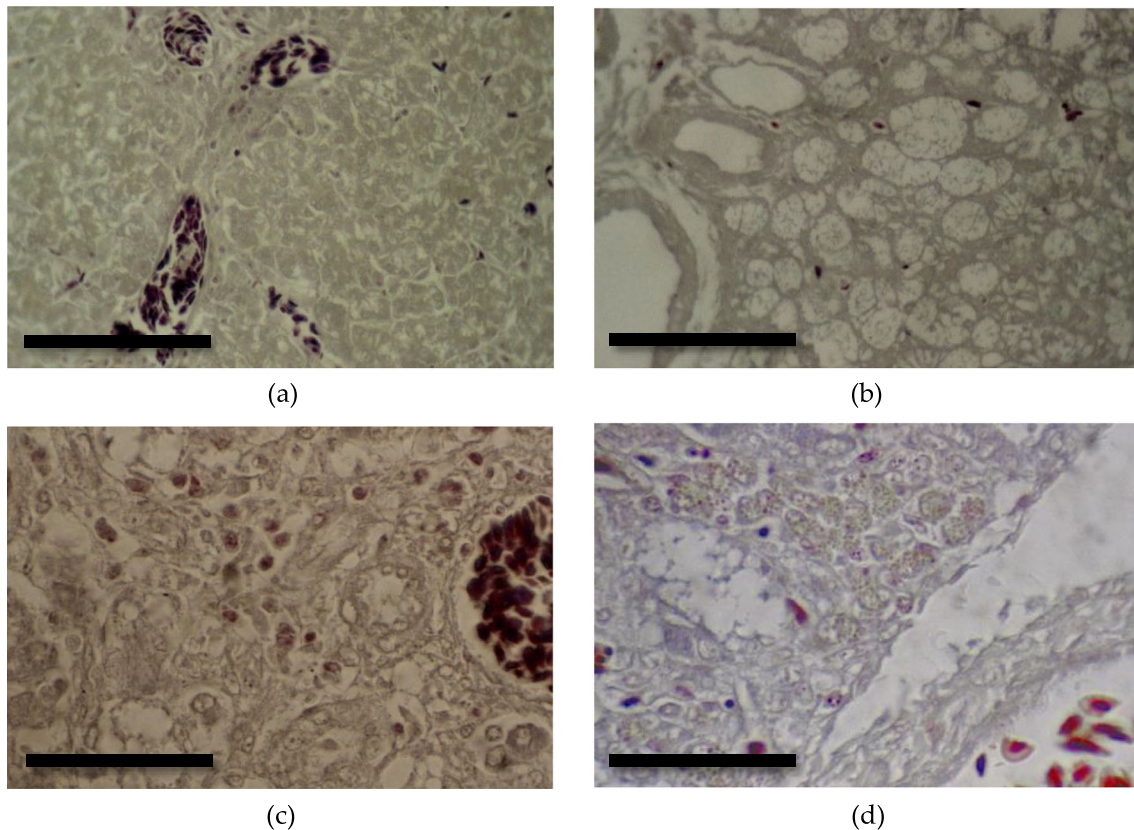


Fig. 2 Chicken liver tissue treated with Gram's method of staining ($\times 100$). Control, chickens fed an AFB₁-free diet; AF, chickens fed an AFB₁-contaminated diet; SE, chickens fed an AFB₁-free diet challenged with

10^8 cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old; AF + SE, chickens fed an AFB₁-contaminated diet challenged with 10^8 cfu of *S. Enteritidis* per bird at 18 days old. Scale bar = 50 μ m

impact on *Salmonella* spp. translocation or seroconversion in inoculated pigs.

Studies have demonstrated that *Salmonella* spp. also induce disruption of tight junctions (Awad et al. 2017), and the expression of inflammatory cytokines (Overman et al. 2012). In this study, the total intestinal IgA levels were determined as a biomarker to evaluate intestinal inflammation, since this immunoglobulin has been previously used to evaluate local humoral immunity in broiler chickens challenged with this pathogen (Husáková et al. 2015). The results showed that IgA expression increased up to 9394 ng/mL in chickens challenged with *S. Enteritidis* in a short period of time after challenge, while control chickens had a basal level of 5770 ng/mL (Table 3). The higher total intestinal IgA levels may be directly related to the severity of *S. Enteritidis* infection (Hernandez-Patlan et al. 2019). For AF + SE group, intestinal IgA level did not differ significantly between AF and control groups, showing that AFB₁ has an immunosuppressive effect, probably attributed to a significant decrease in the number of IgA⁺ cells in the duodenum, jejunum, and ileum, and a reduced expression of IgA, pIgR, IgM, and IgG mRNA in the small intestine (Jiang et al. 2015). Thus, the humoral local antibody response against *S. Enteritidis* was slightly reduced.

The intestinal absorption of AFB₁ may be accomplished by several possible routes: (i) a portion of the AFB₁ passes intact through the epithelial layer; (ii) AFB₁ penetrates the enterocyte by passive transport and molecules are converted to the active epoxide by the Cytochrome P450 forming an adduct with proteins, and subsequently, adducts arrive to the liver through the portal vein; (iii) due to their lipophilic nature, AFB₁ is absorbed via paracellular route damaging tight junctions, and consequently, AFB₁ has a direct impact on gut epithelium. Besides, leaky gut could be a result of an indirect effect of AFB₁ toxicity, since increased intestinal permeability has been also associated with the pathogenesis of both liver and kidney (Cesaro et al. 2011).

Taken together, these results suggest that AFB₁ exerts direct and indirect effects on the gut epithelium, and may be partially responsible for the physiological and metabolic disorders in poultry during aflatoxicosis. To the best of our knowledge, this is the first report on the effect of moderate-dose AFB₁ (470 ng/g feed) on gut barrier in broiler chickens. However, a more comprehensive knowledge of these effects will improve our understanding of the link between moderate intake of AFB₁, gut barrier, and bacterial invasiveness in poultry. Further studies to evaluate gene expression of tight junction proteins are currently being evaluated.

Acknowledgments J.O. Hernández-Ramírez acknowledges CONACyT for the Ph.D. scholarship (245747).

Funding information This work was partially supported by Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI) Grant number PIAPI-1806.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest None.

References

- Asao T, Buchi G, Abdel-Kader M, Chang S, Wick EL, Wogan G (1963) Aflatoxins B and G. *J Am Chem Soc* 85:1706–1707
- Awad W, Hess C, Hess M (2017) Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. *Toxins* 9:60
- Baxter MF, Merino-Guzman R, Latorre JD, Mahaffey BD, Yang Y, Teague KD, Graham LE, Wolfenden AD, Hernandez-Velasco X, Bielke LR, Hargis BM, Tellez G (2017) Optimizing fluorescein isothiocyanate dextran measurement as a biomarker in a 24-h feed restriction model to induce gut permeability in broiler chickens. *Front Vet Sci* 4:56
- Burel C, Tanguy M, Guerre P, Boilletot E, Cariolet R, Queguiner M, Postolec G, Pinton P, Salvat G, Oswald IP, Fravallo P (2013) Effect of low dose of fumonisins on pig health: immune status, intestinal microbiota and sensitivity to *Salmonella*. *Toxins* 5:841–864
- Cesaro C, Tiso A, Del Prete A, Cariello R, Tuccillo C, Cotticelli G, del Vecchio Blanco C, Loguercio C (2011) Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Dig Liver Dis* 43:431–438
- Chen X, Naehrer K, Applegate T (2016) Interactive effects of dietary protein concentration and aflatoxin B1 on performance, nutrient digestibility, and gut health in broiler chicks. *Poult Sci* 95:1312–1325
- Coenen A, Smit A, Zhonghua L, Van Luijckelaar G (2000) Gas mixtures for anaesthesia and euthanasia in broiler chickens. *Worlds Poult Sci J* 56:226–234
- del Pilar Monge M, Magnoli CE, Chiacchiera SM (2012) Survey of *Aspergillus* and *Fusarium* species and their mycotoxins in raw materials and poultry feeds from Córdoba, Argentina. *Mycotoxin Res* 28:111–122
- Feibelman TP, Cotty PJ, Doster M, Michailides T (1998) A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. *Mycologia* 90:618–623
- Galarza-Seeber R, Latorre JD, Bielke LR, Kuttappan VA, Wolfenden AD, Hernandez-Velasco X, Merino-Guzman R, Vicente JL, Donoghue A, Cross D, Hargis BM, Tellez G (2016) Leaky gut and mycotoxins: aflatoxin B1 does not increase gut permeability in broiler chickens. *Front Vet Sci* 3:10
- Gratz S, Wu Q, El-Nezami H, Juvonen R, Mykkänen H, Turner P (2007) *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 73:3958–3964
- Grenier B, Applegate T (2013) Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins* 5:396–430
- Hernández-Meléndez D, Salas-Téllez E, Zavala-Franco A, Téllez G, Méndez-Albores A, Vázquez-Durán A (2018) Inhibitory effect of flower-shaped zinc oxide nanostructures on the growth and aflatoxin production of a highly toxigenic strain of *Aspergillus flavus* Link. *Materials* 11:1265
- Hernandez-Patlan D, Solis-Cruz B, Adhikari B, Pontin KP, Latorre JD, Baxter MF, Hernandez-Velasco X, Merino-Guzman R, Méndez-Albores A, Kwon YM, Hargis BM, Lopez-Arellano R, Arreguin-Nava MA, Tellez-Isaias G (2019) Evaluation of the antimicrobial and intestinal integrity properties of boric acid in broiler chickens infected with *Salmonella enteritidis*: proof of concept. *Res Vet Sci* 123:7–13
- Husáková E, Bobíková K, Stašová D (2015) Total IgA in spleen, bursa and intestine of chickens pretreated with *E. faecium* AL41 and

- challenged with Salmonella Enteritidis PT4. *Food Agric Immunol* 26:366–370
- Ilan Y (2012) Leaky gut and the liver: a role for bacterial translocation in nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 18:2609
- Jardon-Xicotencatl S, Díaz-Torres R, Marroquín-Cardona A, Villarreal-Barajas T, Méndez-Albores A (2015) Detoxification of aflatoxin-contaminated maize by neutral electrolyzed oxidizing water. *Toxins* 7:4294–4314
- Jiang M, Fang J, Peng X, Cui H, Yu Z (2015) Effect of aflatoxin B1 on IgA⁺ cell number and immunoglobulin mRNA expression in the intestine of broilers. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 37:450–457
- Kasuga F, Hara-Kudo Y, Saito N, Kumagai S, Sugita-Konishi Y (1998) In vitro effect of deoxynivalenol on the differentiation of human colonic cell lines Caco-2 and T84. *Mycopathologia* 142:161–167
- Kubena LF, Huff WE, Harvey RB, Phillips TD, Rottinghaus GE (1989) Individual and combined toxicity of deoxynivalenol and T-2 toxin in broiler chicks. *Poult Sci* 68:622–626
- McLaughlin J, Padfield PJ, Burt JP, O'Neill CA (2004) Ochratoxin A increases permeability through tight junctions by removal of specific claudin isoforms. *Am J Phys Cell Physiol* 287:C1412–C1417
- Méndez-Albores A, Arambula-Villa G, Loarca-Piña M, Castano-Tostado E, Moreno-Martínez E (2005) Safety and efficacy evaluation of aqueous citric acid to degrade B-aflatoxins in maize. *Food Chem Toxicol* 43:233–238
- Merino-Guzmán R, Latorre JD, Delgado R, Hernandez-Velasco X, Wolfenden AD, Teague KD, Graham LE, Mahaffey BD, Baxter MFA, Hargis BM, Tellez G (2017) Comparison of total immunoglobulin A levels in different samples in Leghorn and broiler chickens. *Asian Pac J Trop Biomed* 7:116–120
- Nacional Research Council, (NRC) (1994) Nutrient requirements of chickens. In: Nutrient requirements of poultry. 8th rev. National Academy Press, Washington DC, pp 11–15
- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002 Productos y Servicios: Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, especificaciones sanitarias. *Diario Oficial de la Federacion*. 2002:11 de Marzo de 1999.
- Ostry V, Malir F, Toman J, Grosse Y (2017) Mycotoxins as human carcinogens—the IARC monographs classification. *Mycotoxin Res* 33:65–73
- Overman EL, Rivier JE, Moeser AJ (2012) CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF- α . *PLoS One* 7:e39935
- Pinton P, Nougayrède JP, Del Rio JC, Moreno C, Marin DE, Ferrier L, Bracarense AP, Kolf-Clauw M, Oswald IP (2009) The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 237:41–48
- Raju M, Rao S, Radhika K, Chawak M (2005) Dietary supplementation of Spirulina and its effects on broiler chicken exposed to aflatoxicosis. *Indian J Poult Sci* 40:36–40
- Rawal S, Kim JE, Coulombe R Jr (2010) Aflatoxin B1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention. *Res Vet Sci* 89:325–331
- Romero A, Ares I, Ramos E, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez MA (2016) Mycotoxins modify the barrier function of Caco-2 cells through differential gene expression of specific claudin isoforms: protective effect of illite mineral clay. *Toxicology* 353:21–33
- Sapkota D, Islam R, Upadhyaya T (2006) Dietary supplementation of *Embllica officinalis* for amelioration of experimental aflatoxicosis in commercial broilers. *Anim Nutr Feed Technol* 6:65–71
- SAS Institute (2002) SAS/STAT User's guide release 9.0 edition. SAS institute, Cary
- Seki E, Schnabl B (2012) Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol* 590: 447–458
- Sergent T, Parys M, Garsou S, Pussemier L, Schneider YJ, Larondelle Y (2006) Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicol Lett* 164:167–176
- Tejada-Castaneda Z, Avila-Gonzalez E, Casaubon-Huguenin M, Cervantes-Olivares R, Vásquez-Peláez C, Hernandez-Baumgarten E, Moreno-Martínez E (2008) Biotoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poult Sci* 87:1569–1576
- Vicuña EA, Kuttappan VA, Tellez G, Hernandez-Velasco X, Seber-Galarza R, Latorre JD, Faulkner OB, Wolfenden AD, Hargis BM, Bielke LR (2015) Dose titration of FITC-D for optimal measurement of enteric inflammation in broiler chicks. *Poult Sci* 94:1353–1359
- Weibking TS, Ledoux DR, Bermudez AJ, Turk JR, Rottinghaus GE, Wang E, Merrill AH Jr (1993) Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. *Poult Sci* 72:456–466

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Mitigation of AFB₁-Related Toxic Damage to the Intestinal Epithelium in Broiler Chickens Consumed a Yeast Cell Wall Fraction

Juan Omar Hernández-Ramírez¹, Rubén Merino-Guzmán², Guillermo Téllez-Isaías³, Alma Vázquez-Durán¹ and Abraham Méndez-Albores^{1*}

¹ Unidad de Investigación Multidisciplinaria L14 (Alimentos, Micotoxinas, y Micotoxicosis), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ³ Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Shourong Shi,
Chinese Academy of Agricultural
Sciences, China

Reviewed by:

Yosra Ahmed Soltan,
Alexandria University, Egypt
F. Capela e Silva,
University of Evora, Portugal
Guanhong Li,
Jiangxi Agricultural University, China

*Correspondence:

Abraham Méndez-Albores
albores@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Animal Nutrition and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 08 March 2021

Accepted: 21 June 2021

Published: 26 July 2021

Citation:

Hernández-Ramírez JO,
Merino-Guzmán R, Téllez-Isaías G,
Vázquez-Durán A and
Méndez-Albores A (2021) Mitigation of
AFB₁-Related Toxic Damage to the
Intestinal Epithelium in Broiler
Chickens Consumed a Yeast Cell Wall
Fraction. *Front. Vet. Sci.* 8:677965.
doi: 10.3389/fvets.2021.677965

In vivo experiments were conducted to evaluate the effectiveness of a yeast cell wall fraction (YCW) to reduce the negative impact of aflatoxin B₁ (AFB₁) to the intestinal epithelium in broiler chickens. Zeta potential (ζ -potential), point of zero charge (pH_{pzc}), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and scanning electron microscopy (SEM) techniques were used to characterize the YCW. Two hundred one-day-old male Ross 308 broiler chickens were randomly allocated into four treatments: (1) control, chickens fed an AFB₁-free diet; (2) AF, chickens feed an AFB₁-contaminated diet (500 ng AFB₁/g); (3) YCW, chickens fed an AFB₁-free diet + 0.05% YCW; and (4) AF + YCW, chickens fed an AFB₁-contaminated diet (500 ng AFB₁/g) + 0.05% YCW. At the end of the 21-day feeding period, fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-d) was administered to chicks by oral gavage to evaluate gastrointestinal leakage. Blood and duodenum samples were collected to assess serum biochemistry and histomorphology, respectively. Compared to the control group, chicks of the AF group significantly diminished weight gain (WG) and average daily feed intake (ADFI), and increased feed conversion ratio (FCR), mortality rate (MR), and intestinal lesion scores ($p < 0.05$). Alterations in some serum biochemical parameters, and damage to the intestinal integrity were also evident in the AF-intoxicated birds. YCW supplementation improved WG and FCR and increased villus height, villus area, crypt depth, and the number of goblet cells in villi. The effects of YCW on growth performance were not significant in chicks of the AF + YCW group; however, the treatment decreased MR and significantly ameliorated some biochemical and histomorphological alterations. The beneficial effect of YCW was more evident in promoting gut health since chickens of the AF + YCW group presented a significant reduction in serum FITC-d concentration. This positive effect was mainly related to the changes in negative charges of YCW due to changes in pH, the net negative surface charge above the pH_{pzc}, the higher quantities of negative charged functional groups on the YCW surface, and its ability to form large aggregates. From these results, it can be concluded that YCW at low supplementation level can partially protect broilers' intestinal health from chronic exposure to AFB₁.

Keywords: broilers, AFB₁, yeast cell wall, intestinal permeability, histomorphology

INTRODUCTION

Filamentous fungi, particularly *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium*, are capable of forming secondary metabolites known as mycotoxins. Among the many toxic metabolites identified, some of them are potent carcinogens, which can provoke acute or chronic intoxications in both humans and animals. In agricultural commodities, the most frequently encountered mycotoxins are aflatoxins, ochratoxin A, patulin, fumonisins, trichothecenes (deoxynivalenol, T-2 toxin, and HT-2), and zearalenone (1). Some mycotoxigenic fungi can produce more than one toxin, and some mycotoxins are synthesized by multiple fungal species (2). In comparison with other mycotoxins, the safety level for aflatoxins in poultry feedstuffs is low; as a result, poultry feed is always at risk of contamination with aflatoxins, which are frequently found in maize destined for animal feed. When toxigenic *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, or *Aspergillus nomius* isolates grow in poultry feedstuffs, they can synthesize a variety of toxic secondary metabolites, including aflatoxin B₁ (AFB₁), aflatoxin B₂ (AFB₂), aflatoxin G₁ (AFG₁), and aflatoxin G₂ (AFG₂). As a result, the accumulation of these toxic metabolites in animal tissues may result in an indirect exposure to humans by consuming the contaminated products such as meat or eggs.

Notwithstanding attempts to monitor fungal and mycotoxin contamination, both developing and developed countries have confirmed widespread contamination. To detoxify mycotoxin-contaminated feeds and feedstuffs, various methods have been proposed based on physical, chemical, and biological approaches. Detoxifying agents are substances that may reduce mycotoxin contamination in feed by suppressing or reducing their absorption, promoting their excretion, or changing their mode of action. These substances—called mycotoxin detoxifiers—are added to animals' diet (poultry, swine, and cattle) to minimize toxin absorption and dissemination to blood and target organs. Based on their mode of action, mycotoxin detoxifiers can bind, inactivate, degrade, or transform mycotoxins into less toxic substances. Activated charcoal, hydrated sodium calcium aluminosilicates, polymers, zeolites, agro-waste materials, yeast, and yeast products are examples of adsorbent materials that can be utilized to reduce the toxic effects of various mycotoxins (2–4).

Yeast cell wall (YCW), mainly composed of polysaccharides (mannans and glucans), proteins, and lipids, possesses a variety of adsorption sites, with different mechanisms of adsorption including hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and ionic interactions (5). Therefore, YCW could be an alternative over conventional adsorbent materials to bind a wide variety of mycotoxins (6), without reducing nutrient bioavailability or causing negative environmental impacts. While many studies have been conducted to show that YCW can improve broiler performance and intestinal health when challenged with aflatoxins alone or in combination with pathogens (7, 8), just a few studies have looked into the pathways that lead to the formation of complexes involving mycotoxins and YCW components, where some chemical structures such as (1→ 3)-β-D-glucan or (1→ 6)-β-D-glucan play a significant role during the binding process (9–11). Currently, there is a lack of general

TABLE 1 | Chemical composition of the yeast cell wall fraction (YCW) according to manufacturer.

Chemical composition	(%)	Chemical composition	(%)
Dry matter	97–98	Ash	3–5
Protein	14–17	β-Glucans	24–26
Fat	20–22	Mannans	22–24
Phosphorous	1–2	Glucan to mannan ratio	1.1

knowledge about the application of ζ-potential, point of zero charge, Fourier transform infrared spectroscopy, and scanning electron microscopy techniques to characterize the YCW and to understand the interaction between the functional groups present on the YCW surface and the AFB₁ molecule. Consequently, this research aimed to describe and evaluate the effectiveness of a commercial YCW fraction's low content to reduce the negative impact of AFB₁ on the intestinal epithelium in broiler chickens.

MATERIALS AND METHODS

Yeast Cell Walls

A premium yeast cell wall fraction (YCW) from *Saccharomyces cerevisiae* (SafMannan) was kindly provided by Phileo Lesaffre Animal Care (Lesaffre Iberica S.A., Valladolid, Spain). The chemical composition of the commercial YCW fraction according to the manufacturer is shown in **Table 1**.

YCW Characterizations

Zeta Potential (ζ-Potential)

The electrophoretic mobility measurement and conversion to ζ-potential were made using the ZetaSizer Pro (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) following the methodology of Ramales-Valderrama et al. (12). All determinations were done at room temperature by diluting 500 μL of the YCW suspension (0.05% w/v) in 5 ml deionized water. Quintuplicates were evaluated, and each measurement included 30 runs to find a stable reading. Samples were evaluated at three different pH values simulating the poultry gastrointestinal tract's *in vivo* conditions (proventriculus, pH 2; crop, pH 5; and intestine, pH 7).

Point of Zero Charge (pH_{pzc})

The pH_{pzc} was determined following the approach used by Zavala-Franco et al. (13). Briefly, 50 mL of distilled water was adjusted to different pH values (2, 4, 6, 8, 10, and 12) by adding 0.1 M hydrochloric acid or 0.1 M sodium hydroxide. The solutions were added into flasks containing preweighed YCW (25 mg) and stirred (250 rpm) at room temperature for 195 min. The final pH (pH_f) of the suspension was determined, and the pH difference (ΔpH) was computed. All pH measurements were accomplished using a glass electrode (Conductronic PC-45, Puebla, Mexico). Finally, ΔpH was plotted against the initial pH (pH_i), and the point where the line intersects the x-axis gave the pH_{pzc}. All determinations were performed in quintuplicate.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Functional groups of the YCW were characterized using a Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) Frontier SP8000 spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) accessorized with an attenuated total reflection (ATR) accessory (DuraSamplIR II, Smiths Detection, Warrington, UK). Quintuplicate samples (25 mg) were placed on the ATR diamond crystal, and the spectra were recorded in transmittance mode over the range of 4,000–500 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} by coadding 32 scans. The background spectrum of air was subtracted from all the spectra. Additionally, a section of the spectra (the polysaccharide absorbing region, which reveals component structures of mannans and glucans) was baseline corrected, and the resultant FTIR spectrum was further analyzed. The peak areas of the main bands (carbohydrate, protein, and lipid) were computed using the Spectrum 10.4.2 software.

Scanning Electron Microscopy

The morphology and microstructure of the YCW were scrutinized using an InTouch Scope scanning electron microscope (SEM) (JEOL, JSM-6012LA, Tokyo, Japan). To enhance electron conductivity and image quality, samples were coated with a thin gold layer using an electric sputter coater (Denton Vacuum Inc., Desk V HP, Moorestown, NJ, USA) operated at 7 mA for 3 min. Microscopy analysis ($\times 250$) was performed in the secondary electron imaging mode (SEI mode) with an accelerating voltage of 15 kV at a 17-mm effective working distance.

In vivo Experiments

Animal Ethics

The aflatoxin challenge protocol was approved by the Internal Committee for Care and Use of Experimental Animals of the Postgraduate Program in Animal Production and Health Sciences of the National Autonomous University of Mexico. Ethical approval code: CICUAE-C20_5.

Aflatoxin B₁ Production and Preparation of the AFB₁-Contaminated Diet

Aflatoxins (AFB₁ and AFB₂) were produced in maize according to the methodology of Méndez-Albores et al. (14) using a highly toxigenic strain of *A. flavus* (Code UNIGRAS-1231, Culture Collection of the Grain and Seed Research Unit of the National Autonomous University of Mexico). The highly contaminated maize kernels (14,000 ng AFB₁/g) were milled and subsequently mixed in a starter feed formulated to approximate broiler chickens' nutritional requirements (Supplementary Table 1) as recommended by the National Research Council (15). Contamination was performed in batches of 15 kg using 36 g of the aflatoxin-contaminated maize meal per kilogram of feed. Subsequently, the aflatoxin-contaminated poultry feed was mixed for 15 min in a Ribbon Blender Mixer (Molinos Pulvex model MH-7050, Mexico City, Mexico) to ensure proper distribution of the toxins. The adsorbent material was also included in the feed.

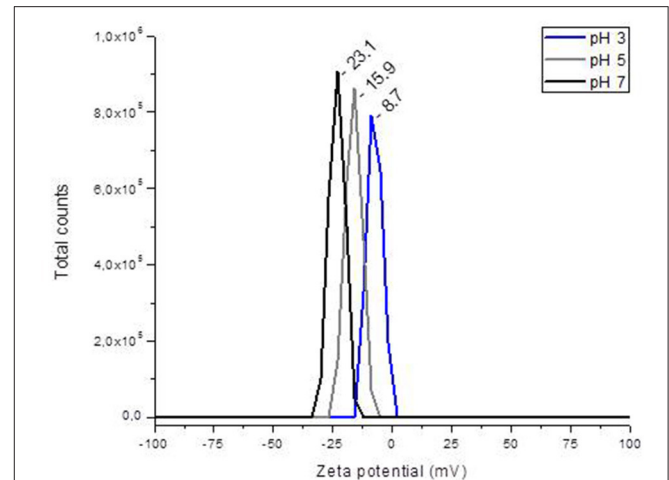


FIGURE 1 | The changes in zeta potential of the yeast cell wall fraction (YCW) with different pH.

Aflatoxin B₁ Quantification

The aflatoxin content in the feed was estimated by immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. Briefly, aflatoxins were cleaned up using immunoaffinity columns Vicam Afla B (Watertown, MA, USA) and the eluate used for ultraperformance liquid chromatography (UPLC) analysis. A modified method previously described by Jardon-Xicotencatl et al. (16) was used. A mobile phase of water/methanol/acetonitrile (64:18:18) was used on an ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1 \times 100 mm, 1.7 μm). The mobile phase was pumped at 0.7 mL/min by a quaternary solvent manager. The aflatoxins eluted in the order of AFB₂ and AFB₁ at 1.57 and 2.00 min, respectively (Supplementary Figure 1). Detection was via an UPLC-optimized fluorescence detector (Waters, Milford, MA, USA) programmed to detect aflatoxins at 365 nm excitation and 429 nm emission. The estimated detection limits were 0.6 and 2.0 ng/kg for AFB₂ and AFB₁, respectively. Finally, the AFB₁ concentration was calculated using a standard reference (AFB₁; CAS number, 1162-65-8, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with a calibration curve. All determinations were done in quintuplicate. The UPLC analysis revealed the presence of AFB₁ (500 ± 21 ng/g feed) and traces of AFB₂ (43 ± 7 ng/g feed). Since AFB₂ is up to 200-fold less toxic than AFB₁ (14), in this research, the presence of AFB₂ was considered insignificant.

Experimental Birds and Housing

A total of 200 1-day-old male broilers (Ross 308) were purchased from a local hatchery. Birds were randomly distributed in four pens at the Poultry Research Station of the National Autonomous University of Mexico. Five replicates of 10 birds ($n = 50$ per treatment) were grouped as follows: (1) control, chickens fed an AFB₁-free diet; (2) AF, chickens feed an AFB₁-contaminated diet (500 ng AFB₁/g); (3) YCW, chickens fed an AFB₁-free diet + 0.05% YCW (the minimum manufacturers' recommended

inclusion rate); and (4) AF + YCW, chickens feed an AFB₁-contaminated diet (500 ng AFB₁/g) + 0.05% YCW. Chicks were maintained at an age-appropriate temperature and given *ad libitum* access to diets and water during the 21-day study. Twice a day, birds were monitored for general health.

Collection of Samples and Measurements

Birds and feed were weighed weekly, and feed efficiency was adjusted for mortality. At 21 days of age, blood samples were collected from 15 randomly selected broilers from each treatment (three birds per replicate) and serum prepared. The following analyses were accomplished spectrophotometrically using commercially available kits (BioSystems, Barcelona, Spain): total protein (code 11500), albumin (code 11547), glucose (code 12503), cholesterol (code 11505), and the enzymatic activities of aspartate aminotransferase (AST, code 11531) and alanine aminotransferase (ALT, code 21533). The bled chickens were then euthanized by CO₂ inhalation, and segments of duodenum (2 cm in length) taken from the gizzard outlet to the end of the pancreatic loop were carefully excised, rinsed three times with cold saline, and fixed in 10% neutral-buffered formalin for 48 h. The paraffin-embedded tissue samples were cut into 4- μ m thick sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Photomicrographs were acquired using an ICC50W camera associated with a Leica DM2500 microscope. The variables measured were the following: villus height (measured from the top of the villus to the upper part of the lamina propria), villus width (taken at the central part of the villus), crypt depth (measured from the base up to the region of transition between the crypt and villus), villus area (villus height \times villus width), and the goblet cell number along the villi membrane, which were counted along 500 μ m of each villus surface. The ImageJ 1.52v software was used for morphometric measurements. In each treatment, 60 measurements were taken per variable.

Serum Determination of Fluorescein Isothiocyanate Dextran Leakage

Fluorescein isothiocyanate dextran (3–5 kDa, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used as a probe to measure gut mucosal barrier integrity. Following the methodology of Baxter et al. (17), 1 h before euthanizing the chickens, 15 randomly selected broilers of each group (three per replicate) were orally gavaged with fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-d) (8.32 mg/kg of body weight). The concentration of FITC-d was fluorometrically estimated in diluted sera as described by Hernández-Ramírez et al. (18). Sera from birds without FITC-d treatment were used as controls.

Experimental Design and Statistical Analysis

Data were analyzed as a completely randomized design using the one-way ANOVA procedure of the Statistical Analysis System software (19). The replicate pens were the experimental units for the analysis, and means were separated using the Tukey procedure at $p < 0.05$ level of significance.

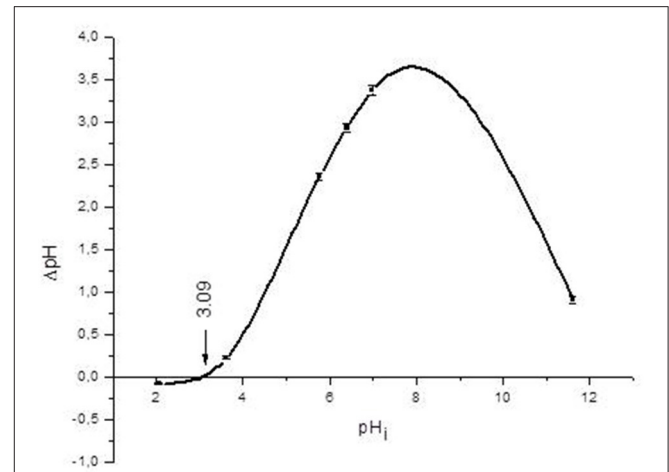


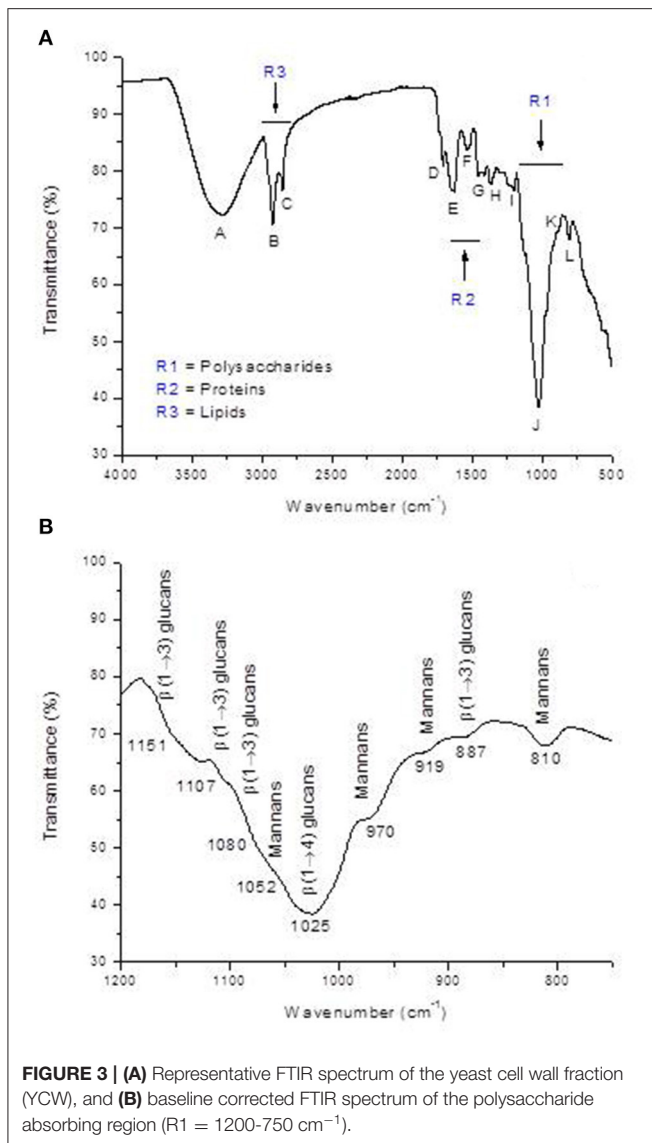
FIGURE 2 | Point of zero charge (pH_{pzc}) of the yeast cell wall fraction (YCW). Mean values \pm standard error.

RESULTS

Characterizations of the YCW Fraction

Figure 1 shows the relationship between ζ -potential and pH. In general, the YCW product had a negative ζ -potential; however, as the pH value increased (from 2 to 7), more negative ζ -potential values were observed. A ζ -potential value of -8.7 ± 1.3 mV was registered at pH 2; however, at pH 5 and 7, the YCW preparation presented ζ -potential values of -15.9 ± 2.5 mV and -23.1 ± 2.1 mV, respectively. The point of zero charge (pH_{pzc}) was determined by plotting ΔpH against the initial pH using the immersion technique. **Figure 2** shows the pH_{pzc} of the YCW preparation. In the pH_{pzc} graphic, the curve intersects the x-axis at pH 3.09, suggesting that the surface charge is zero at this particular pH. In other words, the charge of the positive surface sites is equal to that of the negative ones.

Furthermore, the FTIR spectrum was acquired to identify the specific functional groups present on the YCW product's surface. The representative FTIR spectrum and the baseline-corrected spectrum of the polysaccharide absorbing region (1,200–750 cm^{-1}) are shown in **Figure 3**. From the spectrum, three main regions corresponding to polysaccharides ($R1 = 750\text{--}1,200$ cm^{-1}), proteins ($R2 = 1,400\text{--}1,650$ cm^{-1}), and lipids ($R3 = 2,800\text{--}3,000$ cm^{-1}) can be clearly distinguished (**Figure 3**, profile A). Main absorptions characteristic of polysaccharides are those related to O–H stretching (3,279 cm^{-1}), β -anomeric carbons of β -glucans (1,369 cm^{-1}), C–O stretching and C–OH wagging (1,202 and 1,025 cm^{-1}), β -anomeric carbons of $\beta(1\rightarrow 3)$ glucans (887 cm^{-1}), and mannans (810 cm^{-1}). Characteristic N–H vibrations of proteins were observed at 3,279 cm^{-1} (overlapped by O–H vibrations) and at 1,629 and 1,532 cm^{-1} , which were associated with the amide I and amide II bands, respectively. Finally, C–H stretching bands of lipids were located at approximately 2,922 and 2,849 cm^{-1} , respectively. These bands were also overlapped by the C–H stretching of glucans (**Figure 3**, profile A). Moreover, **Figure 3** (profile B) depicts the



baseline-corrected FTIR spectrum of the carbohydrate absorbing region (frequency range, 1,200–750 cm^{-1}). As can be seen from the spectral magnification, the absorptions at 810, 919, 970, and 1,052 cm^{-1} characterize mannans. Additionally, the bands at 887, 1,080, 1,107, and 1,151 cm^{-1} can be assigned to $\beta(1 \rightarrow 3)$ glucans. Finally, the broad absorption band at 1,025 cm^{-1} is generally associated with the presence of $\beta(1 \rightarrow 4)$ glucans. The assignments of the main vibrational bands are summarized in **Table 2**. Furthermore, as a useful indicator of the three main components' ratio, the total area corresponding to polysaccharide, protein, and lipid regions was computed using the Spectrum 10.4.2 software. The results show the highest intensity in the polysaccharide region, followed by lipid and protein regions, respectively. In general, the polysaccharide was shown approximately 3.9-fold higher than lipid, and the ratio of polysaccharide to protein was 7.8-fold higher. These results are

TABLE 2 | Band assignments of the primary vibrational frequencies in the yeast cell wall fraction (YCW).

Band	Wavenumber (cm^{-1})	Functional group or commonly assigned compound
A	3,279	O–H and N–H stretching vibrations (carbohydrate and protein)
B	2,922	CH_2 antisymmetric stretching (lipids)
C	2,849	C– CH_3 symmetric stretching (lipids)
D	1,711	C=O stretching (phospholipid esters)
E	1,629	Amide I (N–H bending and C=O stretching)
F	1,532	Amide II (C–N stretching and N–H bending)
G	1,455	OH bending vibration in carboxylic acids
H	1,369	β -anomeric carbons (β -glucans)
I	1,202	C–O stretching, C–OH wagging, twisting, and rocking (carbohydrates)
J	1,025	C–O stretching (carbohydrates)
K	887	β -anomeric carbons $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucans
L	810	Mannans (C–O–C, C–C, and C–OH stretching of pyranose ring)

consistent with the chemical composition of the YCW product shown in **Table 1**.

The surface morphology and microstructure of the YCW preparation were assessed using SEM. An illustrative micrograph is shown in **Figure 4**. The image shows mostly β -glucan particles ranging from 20 to 169 μm in size, with some single particles. The majority of the unaggregated particles was approximately $27 \pm 3 \mu\text{m}$ in size; however, the formation of aggregates between β -glucan particles was more noticeable. The SEM image also reveals the ridge-like nature of the β -glucan, with smooth surfaces and rolled-up edges. Finally, the microstructure of β -glucan particles was retained as indicated by their distinctive oval shape.

In vivo Experiment

Data on the performance of experimental broilers are summarized in **Table 3**. At the end of week 1, no significant differences were noted in weight gain (WG) among the four dietary treatments. Nevertheless, by the end of week 2, WG was significantly reduced ($p < 0.05$) in chickens of the AF and AF + YCW groups, respectively. At the end of the trial (week 3), chickens receiving the AFB₁-contaminated diet have a 28% reduction in WG. Moreover, WG was significantly improved (4.8%) in birds of the YCW treatment. Average daily feed intake (ADFI) was affected until 21 days of age. Furthermore, by the end of weeks 2 and 3, feed conversion ratio (FCR) was significantly affected in the AF and AF + YCW groups. Finally, the survival rate was as follows: 92% in the AF group, 96% in the AF + YCW group, and 100% in the control and YCW groups, respectively (**Table 3**). In general, the adverse effects in WG, ADFI, FCR, and survival rate—caused by AFB₁—were significantly alleviated by the YCW treatment, which means that the YCW fraction offers reasonable protection against the harmful effects caused by AFB₁.

Table 4 summarizes the serum biochemical results. AFB₁ caused a significant decrement in total protein, albumin, glucose, and cholesterol concentrations. Compared to the control group, reductions of 29.5, 29.4, 17.6, and 38.8% in those constituents were observed in chickens of the AF group. Additionally, some indications of AFB₁ toxicity were distinguished in the AF and AF + YCW groups' chickens by the serum AST activity level, which increased by 1.6- and 1.3-fold in comparison with the control group, respectively. On the contrary, no significant differences were observed in the ALT activity among all dietary treatments (**Table 4**). In general, the YCW preparation alleviates most of

the biochemical parameters in the serum altered negatively due to AFB₁.

Histomorphological parameters of the broiler's duodenum are summarized in **Table 5**. In general, villus height, villus area, crypt depth, and the number of goblet cells were significantly lower in chickens fed the AFB₁-contaminated diet. The addition of the YCW preparation to the AFB₁-contaminated diet increased villus height (1,211.1 vs. 964.0 μm); however, the value was significantly lower than the observed in the control group (1,435.7 μm). Furthermore, compared to the control group, chickens of the YCW group have higher villus height, villus area, crypt depth, and the number of goblet cells in villi. Villus width was not affected by any dietary treatment (**Table 5** and **Supplementary Figure 2**).

Data on serum concentrations of FITC-d are shown in **Figure 5**. No significant differences were noted in serum levels of FITC-d between the control and YCW groups. However, a significant increment in serum levels of FITC-d was detected in birds fed the AFB₁-contaminated diet, reaching values up to 0.42 ± 0.05 μg FITC-d/ml serum. Interestingly, YCW supplementation of the AFB₁-contaminated diet significantly diminished the serum levels of FITC-d (40.5%). The AFB₁-related toxic damage to the intestinal epithelium in broiler chickens was partially mitigated by incorporating the YCW product into the diet.

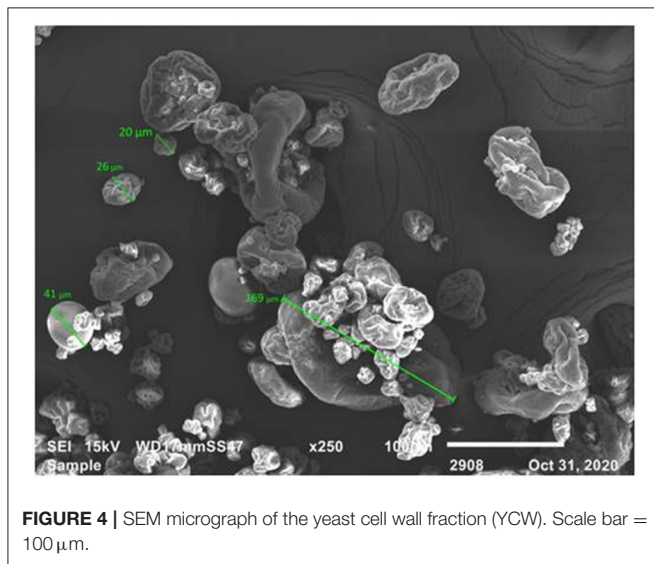


FIGURE 4 | SEM micrograph of the yeast cell wall fraction (YCW). Scale bar = 100 μm.

DISCUSSION

To confirm the effectiveness of the YCW preparation to bind AFB₁, ζ-potential, pH_{pzc}, FTIR, and SEM techniques were employed. The ζ-potential is a measurement of the charges on the surface of colloidal particles. Without a doubt, interface properties are significantly influenced by changes in

TABLE 3 | Production performance of experimental broiler chickens from 1 to 21 days of age.

Attribute	Dietary treatments				SEM	p-value
	Control	YCW	AF	AF + YCW		
WG (g)						
1–7 days	110.7	112.2	100.6	105.9	1.47	0.257
7–14 days	200.4 ^a	212.0 ^a	135.3 ^c	167.3 ^b	8.07	0.001
14–21 days	269.0 ^b	284.0 ^a	181.2 ^d	206.4 ^c	15.41	0.007
1–21 days	580.1 ^b	608.2 ^a	417.1 ^d	479.6 ^c	12.69	0.005
Deviation from control (%)	0	4.8	–28.0	–17.3		
ADFI (g)						
1–7 days	18.98 ^a	19.23 ^a	16.38 ^b	17.70 ^c	0.19	0.009
7–14 days	36.07 ^b	36.65 ^b	33.43 ^c	40.39 ^a	0.11	0.001
14–21 days	51.11 ^a	50.31 ^b	49.44 ^c	50.72 ^b	0.17	0.009
FCR (feed:gain)						
1–7 days	1.20	1.20	1.14	1.17	0.01	0.207
7–14 days	1.26 ^a	1.21 ^a	1.73 ^b	1.69 ^b	0.02	0.002
14–21 days	1.33 ^b	1.24 ^a	1.91 ^d	1.72 ^c	0.04	0.003
MR (%)	0	0	8	4		

Mean of five replicates of 10 chicks each per treatment (minus mortality). Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Tukey test $p < 0.05$). WG, weight gain; ADFI, average daily feed intake; FCR, feed conversion ratio; MR, mortality rate.

TABLE 4 | Selected serum biochemical profiles in broiler chickens at 21 days of age.

Constituent	Dietary treatments				SEM	p-value
	Control	YCW	AF	AF + YCW		
Total protein (g/L)	27.5 ^a	28.9 ^a	19.4 ^c	22.3 ^b	1.65	0.002
Albumin (g/L)	11.9 ^a	12.4 ^a	8.4 ^b	9.1 ^b	0.03	0.001
Glucose (mg/dL)	471.2 ^a	490.9 ^a	388.1 ^b	398.6 ^b	20.9	0.009
Cholesterol (mg/dL)	148.8 ^a	151.7 ^a	91.1 ^b	106.1 ^b	3.75	0.005
AST (U/L)	140.7 ^c	146.6 ^c	227.5 ^a	185.3 ^b	7.38	0.007
ALT (U/L)	14.3	15.6	13.6	13.3	1.00	0.377

Mean of five replicates of three chicks each per treatment ($n = 15$). Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Tukey test $p < 0.05$). AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

TABLE 5 | Histomorphological parameters of the broiler's duodenum at 21 days of age.

Parameter	Dietary treatments				SEM	p-value
	Control	YCW	AF	AF + YCW		
Villus height (μm)	1,435.7 ^b	1,749.5 ^a	964.0 ^d	1211.1 ^c	55.9	0.003
Villus width (μm)	142.7	147.0	136.5	137.9	18.6	0.871
Villus area (mm^2)	0.206 ^b	0.253 ^a	0.131 ^d	0.163 ^c	0.01	0.007
Crypt depth (μm)	161.9 ^b	179.3 ^a	124.4 ^d	137.7 ^c	8.1	0.041
Goblet cell (number/500 μm)	70.4 ^b	96.0 ^a	33.9 ^d	62.1 ^c	2.5	0.001

Mean of 60 measurements per parameter. Means, within the same row, not sharing a common superscript differ significantly (Tukey test $p < 0.05$).

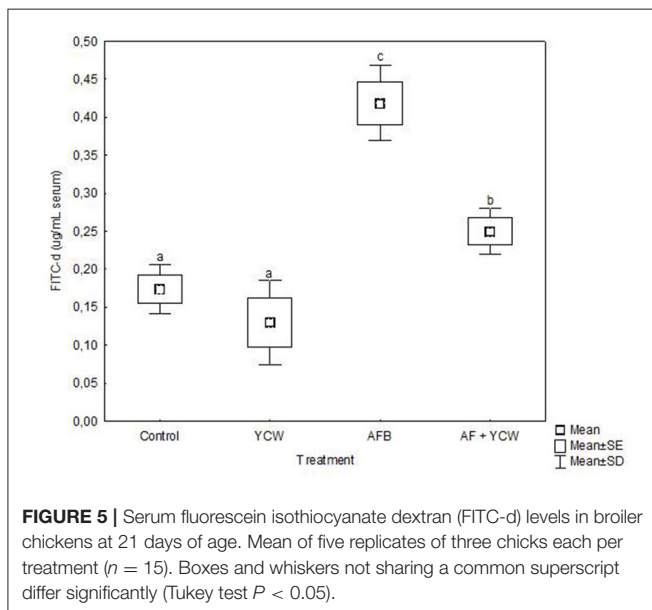


FIGURE 5 | Serum fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-d) levels in broiler chickens at 21 days of age. Mean of five replicates of three chicks each per treatment ($n = 15$). Boxes and whiskers not sharing a common superscript differ significantly (Tukey test $P < 0.05$).

pH, ionic strength, temperature, composition of the medium, among others. As a result, in this work, the YCW preparation was evaluated regarding its ζ -potential at pH values of the proventriculus (pH 2), crop (pH 5), and intestine (pH 7). It was observed that ζ -potential increased significantly with increasing pH reaching the maximum at pH 7 (Figure 1). This ζ -potential shift may be attributed to changes in cell wall charges. These

results are in close agreement with Lavaisse et al. (20), who reported ζ -potential values of -6 and -16 mV for *Saccharomyces cerevisiae* cell wall at pH 3.5 and 5, respectively. On the other hand, the pH_{pzc} also provides useful information about particles' surface charge. The results indicate that the surface charge of the YCW product was zero at pH 3.09 (Figure 2). Thus, the YCW surface remained negatively charged when $\text{pH} > \text{pH}_{\text{pzc}} > 3.09$. As a result, the YCW preparation possesses significant AFB₁-sorption uptakes in the crop (pH 5) and intestine (pH 7). On the contrary, in the proventriculus (pH 2), the contribution of electrostatic interactions would be drastically reduced, as the surface net charge of the YCW product is positive. In the present study, the high negative-charged surface of YCW particles (which remained mostly unchanged at pH values above the pH_{pzc}) can be associated with their ability to remove AFB₁ in some gastrointestinal tract compartments because of the enhancement of attractive forces between the AFB₁ molecule and the YCW surface.

Infrared spectroscopy gives information at the molecular level, allowing the investigation of surface functional groups. In this research, the YCW preparation was further characterized to obtain information about the nature of the interaction between the functional groups present on the YCW surface and the AFB₁ molecule. The FTIR spectrum of the YCW product is shown in Figure 3, profile A. In general, the YCW fraction exhibited higher quantities of functional groups associated with polysaccharides ($3,279$, $1,369$, $1,202$, $1,025$, 887 , and 810 cm^{-1}), lipids ($2,922$, $2,849$, and $1,711$ cm^{-1}), and proteins ($3,279$, $1,629$, and $1,532$ cm^{-1}). These three main components have many

different negatively charged functional groups responsible for the AFB₁ adsorption (4, 10, 11). It has been reported that ~80% of the dry weight of the YCW product is made up of β -glucans and α -mannans (21). Besides, the outer layer of the *S. cerevisiae* cell wall is also composed of phosphomannans, which possess a net negative charge due to the presence of the phosphate group. However, the band associated with this functional group (located at approximately $1,070\text{ cm}^{-1}$) also appears in the polysaccharide absorbing region ($1,200\text{--}750\text{ cm}^{-1}$); as a result, an in-depth band assignment is often complicated. However, glucan and mannan content in the YCW preparation was much higher than that of phosphates (Figure 3, profile B). These results corresponded well with transmittance intensities (or calculated areas) in the FTIR spectrum (Figure 3, profile A), showing the highest intensity/area in the polysaccharide region (R1), followed by lipid (R3) and protein (R2) regions, respectively.

The morphology and microstructure of the YCW product were examined by SEM. This material was determined to be a heterogeneous mixture of individual particles ($27 \pm 3\ \mu\text{m}$ in size) and glucan particle aggregates up to $169\ \mu\text{m}$ in length (Figure 4). Aggregation is a process in which materials joined together to generate themselves a mass or cluster, increasing or decreasing its porosity or density (12). In this research, the changes in cell wall negative charges due to changes in pH, the net negative surface charge above the pH_{pzc} 3.09, the higher quantities of negative charged functional groups on the YCW surface, and the formation of aggregates improved the efficiency and functionality of the YCW preparation resulting in a material with significant interaction with AFB₁.

Aflatoxins cause important losses to the poultry industry due to reduced performance and health problems in the exposed birds. The results presented in Table 3, 4 show that AFB₁ (500 ng AFB₁/g of feed) significantly decreased WG and ADFI, increased FCR and MR, and induced negative changes in some biochemical parameters in broilers. These findings are following the results found by Hernández-Ramírez et al. (18). The authors reported that an experimental diet contaminated with 470 ng AFB₁/g feed produced adverse effects on WG, FCR, MR, and serum biochemistry in broiler chickens at 21 days of age. Comparable results are also reported by other researchers (22–26). Moreover, the addition of the YCW product to the AFB₁-contaminated diet did not alleviate the harmful effects caused by this mycotoxin. Still, it improved WG and FCR during the final stage of the experiment (14–21 days). These results confirm that the YCW preparation effect was undoubtedly due to its ability to adsorb AFB₁, since one of the significant advantages of the glucan-based fractions in animal feeding is to interact with certain mycotoxins. In this context, several *in vitro* and *in vivo* reports have indicated that glucan-based binders prevent the toxic effects of different mycotoxins (6–8, 25, 27–32). In the current work, since the minimum manufacturers' recommended inclusion rate was utilized (0.05% w/w), the moderate efficacy of the YCW product to alleviate the adverse effects of AFB₁ could be due to its saturation with the mycotoxin. Therefore, diets may need to be supplemented with YCW levels higher than 0.05% to achieve significant protective effects against 500 ng AFB₁/g of feed.

The present research revealed positive effects of the YCW product on broiler performance (Table 3). These findings are in close agreement with earlier reports with broilers (33–39). The improved production performance in the YCW group might be related to an improvement in the apparent metabolizable energy intake (40), to the ability of the YCW preparation to stimulate broilers' immunity (41), and to the effects of YCW on disease resistance and gut health (42, 43). The last statement is more plausible because, in this research, the results of the YCW fraction on broiler performance may also be explained by its influence on duodenal histomorphology. In this context, the YCW preparation increased villus height, villus area, crypt depth, and the number of goblet cells in the villi of broiler chickens (Table 5). Similar results have been reported by different researchers (33, 35, 44–46).

Intestinal health is important for broiler performance. When it is impaired, gut histomorphology and gut barrier are damaged. In this sense, different *in vivo* studies have demonstrated that aflatoxins compromise the gastrointestinal tract's fundamental functions, including loss of barrier function (18, 47, 48). In the present study, intestinal permeability was significantly increased in the AF group (Figure 5), since birds presented a considerable increment in serum FITC-d concentration (up to $0.42 \pm 0.05\ \mu\text{g}/\text{mL}$ serum). However, the YCW fraction's addition to the AFB₁-contaminated diet significantly diminished the serum levels of FITC-d ($0.25 \pm 0.03\ \mu\text{g}/\text{mL}$ serum). These results confirm that the YCW fraction counteracted—to some extent—the AFB₁-related toxic damage to the intestinal epithelium in broiler chickens. In this work, the insoluble property and structural conformation allowed β -glucans to adsorb AFB₁ molecules mitigating their impact on the gastrointestinal tract. Unfortunately, the YCW fraction did not improve the intestinal epithelium's turnover and regeneration speed in birds of the AF + YCW group (Table 5). However, in addition to a significant increment in the villus height, a higher density of goblet cells was recorded in chickens of the AF + YCW group when compared with the AF group (62.1 vs. 32.9 cell/500 μm). These findings also support the idea that the YCW product alleviates the toxic effects of AFB₁ on some histomorphological parameters of the duodenum. Furthermore, compared to the control group, a higher density of goblet cells was also recorded in chickens of the YCW group, suggesting that the YCW fraction can induce the proliferation of goblet cells (Table 5). Different authors have also reported an increased density of goblet cells in broilers-fed diets containing YCW (36, 49). Goblet cells are responsible for the synthesis, storage, and secretion of mucin—a high molecular weight glycoprotein—which represents the first line of defense of the small intestine against mycotoxins (50). In general, the quantity of mucin secreted is directly proportional to the number of goblet cells in villi. Consequently, in this research, an increase in the number of goblet cells in chickens of the AF + YCW group can be positively considered in view of mucus, protective effect against AFB₁. Data on the effects of AFB₁ on intestinal mucus production in broilers are still meager. However, Wu et al. (51) investigated the individual and combined effect of AFM₁ ($12\ \mu\text{M}$), ochratoxin A ($20\ \mu\text{M}$), and zearalenone ($100\ \mu\text{M}$)

on the secretion of mucin-like glycoproteins in Caco-2/HT29-MTX cocultures. The authors found that double- and triple-mycotoxin combinations significantly reduced the expression of the highly glycosylated gel-forming mucins MUC2 and MUC5B. As a result, the researchers concluded that increased intestinal permeability is associated with a decrease in mucin secretion. To our knowledge, this is the first report on the effect of AFB₁ (500 ng/g feed) on gut histomorphology and gut barrier in broiler chickens with low dietary supplementation of a commercial YCW product (0.5 g/kg). However, further *in vivo* studies will help improve our understanding of the link between AFB₁, mucus production, and intestinal permeability in poultry.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Internal Committee for Care and Use of Experimental Animals of the Postgraduate Program in Animal Production and Health Sciences of the National Autonomous University of Mexico. Ethical approval code: CICUAE-C20_5.

REFERENCES

- Luo Y, Liu X, Li J. Updating techniques on controlling mycotoxins—a review. *Food Control*. (2018) 89:123–32. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.01.016
- Vila-Donat P, Marín S, Sanchis V, Ramos A. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food Chem Toxicol*. (2018) 114:246–59. doi: 10.1016/j.fct.2018.02.044
- Abd El-Hack ME, Samak DH, Noreldin AE, El-Naggar K, Abdo M. Probiotics and plant-derived compounds as eco-friendly agents to inhibit microbial toxins in poultry feed: a comprehensive review. *Environ Sci Pollut Res*. (2018) 25:31971–86. doi: 10.1007/s11356-018-3197-2
- Nava-Ramírez MJ, Salazar AM, Sordo M, López-Coello C, Téllez-Isaías G, Méndez-Albore A, et al. Ability of low contents of biosorbents to bind the food carcinogen aflatoxin B1 *in vitro*. *Food Chem*. (2021) 345:128863. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128863
- Joannis-Cassan C, Tozlovanu M, Hadjeba-Medjdoub K, Ballet N, Pfohl-Leszkoewicz A. Binding of zearalenone, aflatoxin B1, and ochratoxin A by yeast-based products: a method for quantification of adsorption performance. *J Food Prot*. (2011) 74:1175–85. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-023
- Mendieta CR, Gómez GV, Del Río JCG, Cuevas AC, Arce JM, Ávila EG. Effect of the addition of *saccharomyces cerevisiae* yeast cell walls to diets with mycotoxins on the performance and immune responses of broilers. *Poult Sci J*. (2018) 55:38–46. doi: 10.2141/jpsa.0170019
- Oliveira AA, Keller KM, Deveza MV, Keller LAM, Dias EO, Martini-Santos BJ, et al. Effect of three different anti-mycotoxin additives on broiler chickens exposed to aflatoxin B1. *Arch Med Vet*. (2015) 47:175–83. doi: 10.4067/S0301-732X2015000200008
- Liu N, Wang J, Jia S, Chen Y, Wang J. Effect of yeast cell wall on the growth performance and gut health of broilers challenged with aflatoxin B1 and necrotic enteritis. *Poult Sci*. (2018) 97:477–84. doi: 10.3382/ps/pex342
- Yiannikouris A, André G, Poughon L, François J, Dussap C-G, Jeminet G, et al. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans. *Biomacromolecules*. (2006) 7:1147–55. doi: 10.1021/bm050968t
- Jouany J-P, Yiannikouris A, Bertin G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Arch Zootech*. (2005) 8:26–50.
- Walter PP, Tünde P, István P. Mycotoxins—prevention and decontamination by yeasts. *J Basic Microbiol*. (2015) 55:805–18. doi: 10.1002/jobm.201400833
- Ramales-Valderrama RA, Vázquez-Durán A, Méndez-Albore A. Biosorption of B-aflatoxins using biomasses obtained from *formosa* firethorn [*Pyracantha koidzumii* (Hayata) Rehder]. *Toxins*. (2016) 8:218. doi: 10.3390/toxins8070218
- Zavala-Franco A, Hernández-Patlán D, Solís-Cruz B, López-Arellano R, Téllez-Isaías G, Vázquez-Durán A, et al. Assessing the aflatoxin B1 adsorption capacity between biosorbents using an *in vitro* multicompartmental model simulating the dynamic conditions in the gastrointestinal tract of poultry. *Toxins*. (2018) 10:484. doi: 10.3390/toxins10110484
- Méndez-Albore A, Arambula-Villa G, Loarca-Piña M, Castano-Tostado E, Moreno-Martínez E. Safety and efficacy evaluation of aqueous citric acid to degrade B-aflatoxins in maize. *Food Chem Toxicol*. (2005) 43:233–8. doi: 10.1016/j.fct.2004.09.009
- NRC. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. Washington, DC: National Academy Press (1994).
- Jardon-Xicotencatl S, Díaz-Torres R, Marroquín-Cardona A, Villarreal-Barajas T, Méndez-Albore A. Detoxification of aflatoxin-contaminated maize by neutral electrolyzed oxidizing water. *Toxins*. (2015) 7:4294–314. doi: 10.3390/toxins7104294
- Baxter MF, Merino-Guzmán R, Latorre JD, Mahaffey BD, Yang Y, Teague KD, et al. Optimizing fluorescein isothiocyanate dextran measurement as a biomarker in a 24-h feed restriction model to induce gut permeability in broiler chickens. *Front Vet Sci*. (2017) 4:56. doi: 10.3389/fvets.2017.00056
- Hernández-Ramírez J, Nava-Ramírez M, Merino-Guzmán R, Téllez-Isaías G, Vázquez-Durán A, Méndez-Albore A. The effect of moderate-dose aflatoxin

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JH-R, AV-D, and AM-A conceived and designed the experiment and wrote the paper. JH-R acquired, analyzed, and interpreted the data, and performed the statistical analysis. RM-G and GT-I took part in the discussion and helped in editing the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI) grant numbers 299804 and PIAPI-2001.

ACKNOWLEDGMENTS

JH-R acknowledges CONACyT for the Ph.D. scholarship (245747).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.677965/full#supplementary-material>

- B 1 and Salmonella Enteritidis infection on intestinal permeability in broiler chickens. *Mycotoxin Res.* (2020) 36:31–9. doi: 10.1007/s12550-019-00367-7
19. SAS Institute. *SAS User Guide. Version 9.1*. Cary, NC: SAS Institute Inc (2002).
 20. Lavaisse LM, Hollmann A, Nazareno MA, Disalvo EA. Zeta potential changes of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and respiratory cycles. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* (2019) 174:63–9. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.11.001
 21. Bowen WR, Sabuni HA, Ventham TJ. Studies of the cell-wall properties of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Biotechnol Bioeng.* (1992) 40:1309–18. doi: 10.1002/bit.260401104
 22. Miazzo R, Peralta M, Magnoli C, Salvano M, Ferrero S, Chiacchiera S, et al. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poult Sci.* (2005) 84:1–8. doi: 10.1093/ps/84.1.1
 23. Miazzo R, Rosa C, Carvalho EDQ, Magnoli C, Chiacchiera S, Palacio G, et al. Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poult Sci.* (2000) 79:1–6. doi: 10.1093/ps/79.1.1
 24. Rauber R, Dilkin P, Giacomini L, de Almeida CA, Mallmann C. Performance of turkey poult fed different doses of aflatoxins in the diet. *Poult Sci.* (2007) 86:1620–4. doi: 10.1093/ps/86.8.1620
 25. Zhao J, Shirley R, Dibner J, Uraizee F, Officer M, Kitchell M, et al. Comparison of hydrated sodium calcium aluminosilicate and yeast cell wall on counteracting aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult Sci.* (2010) 89:2147–56. doi: 10.3382/ps.2009-00608
 26. Khadem A, Sharifi S, Barati M, Borji M. Evaluation of the effectiveness of yeast, zeolite and active charcoal as aflatoxin adsorbents in broiler diets. *Global Vet.* (2012) 4:426–32.
 27. Santin E, Paulillo A, Krabbe E, Alessi A, Polveiro W, Maiorka A. Low level of aflatoxin in broiler at experimental conditions. Use of cell wall yeast as adsorbent of aflatoxin. *Arch Vet Sci.* (2003) 8:51–5. doi: 10.5380/avs.v8i2.4035
 28. Santin E, Paulillo A, Nakagui L, Alessi A, Maiorka A. Evaluation of yeast cell wall on the performance of broilers fed diets with or without mycotoxins. *Rev Bras Cienc Avic.* (2006) 8:221–5. doi: 10.1590/S1516-635X2006000400004
 29. Yiannikouris A, François J, Poughon L, Dussap C-G, Bertin G, Jeminet G, et al. Alkali extraction of β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone. *J Agric Food Chem.* (2004) 52:3666–73. doi: 10.1021/jf035127x
 30. Stanley VG, Ojo R, Woldebenet S, Hutchinson DH, Kubena LF. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult Sci.* (1993) 72:1867–72. doi: 10.3382/ps.0721867
 31. Hamza Z, El-Hashash M, Aly S, Hathout A, Soto E, Sabry B, et al. Preparation and characterization of yeast cell wall beta-glucan encapsulated humic acid nanoparticles as an enhanced aflatoxin B1 binder. *Carbohydr Polym.* (2019) 203:185–92. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.08.047
 32. Zhao L, Feng Y, Wei J-T, Zhu M-X, Zhang L, Zhang J-C, et al. Mitigation effects of bentonite and yeast cell wall binders on AFB1, DON, and OTA induced changes in laying hen performance, egg quality, and health. *Toxins.* (2021) 13:156. doi: 10.3390/toxins13020156
 33. Muthusamy N, Haldar S, Ghosh T, Bedford M. Effects of hydrolysed *Saccharomyces cerevisiae* yeast and yeast cell wall components on live performance, intestinal histo-morphology and humoral immune response of broilers. *Br Poult Sci.* (2011) 52:694–703. doi: 10.1080/00071668.2011.633072
 34. Gao J, Zhang H, Yu S, Wu S, Yoon I, Quigley J, et al. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poult Sci.* (2008) 87:1377–84. doi: 10.3382/ps.2007-00418
 35. Pascual A, Pauletto M, Giantin M, Radaelli G, Ballarin C, Birolo M, et al. Effect of dietary supplementation with yeast cell wall extracts on performance and gut response in broiler chickens. *J Anim Sci Biotechnol.* (2020) 11:1–11. doi: 10.1186/s40104-020-00448-z
 36. Reisinger N, Ganner A, Masching S, Schatzmayr G, Applegate TJ. Efficacy of a yeast derivative on broiler performance, intestinal morphology and blood profile. *Livest Sci.* (2012) 143:195–200. doi: 10.1016/j.livsci.2011.09.013
 37. Santin E, Maiorka A, Macari M, Grecco M, Sanchez J, Okada T, et al. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Appl Poultry Res.* (2001) 10:236–44. doi: 10.1093/japr/10.3.236
 38. Ghosh T, Haldar S, Bedford M, Muthusami N, Samanta I. Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses. *J Anim Physiol Anim Nutr.* (2012) 96:275–84. doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01155.x
 39. Fowler J, Hashim M, Haq A, Bailey C. Yeast cell wall and live yeast products and their combination in broiler diets formulated with weekly ingredient variations. *J Anim Physiol Anim Nutr.* (2015) 99:932–7. doi: 10.1111/jpn.12330
 40. Yang Y, Iji P, Kocher A, Thomson E, Mikkelsen L, Choct M. Effects of mannanoligosaccharide in broiler chicken diets on growth performance, energy utilisation, nutrient digestibility and intestinal microflora. *Br Poult Sci.* (2008) 49:186–94. doi: 10.1080/00071660801998613
 41. Brown G, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature.* (2001) 413:36–7. doi: 10.1038/35092620
 42. Li X, Chen Y, Cheng Y, Yang W, Wen C, Zhou Y. Effect of yeast cell wall powder with different particle sizes on the growth performance, serum metabolites, immunity and oxidative status of broilers. *Anim Feed Sci Technol.* (2016) 212:81–9. doi: 10.1016/j.anifeeds.2015.12.011
 43. Shanmugasundaram R, Sifri M, Selvaraj RK. Effect of yeast cell product supplementation on broiler cecal microflora species and immune responses during an experimental coccidial infection. *Poult Sci.* (2013) 92:1195–201. doi: 10.3382/ps.2012-02991
 44. Baurhoo B, Goldflus F, Zhao X. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. *Int J Poult Sci.* (2009) 8:133–7. doi: 10.3923/ijps.2009.133.137
 45. Baurhoo B, Phillip L, Ruiz-Feria C. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poult Sci.* (2007) 86:1070–8. doi: 10.1093/ps/86.6.1070
 46. Kim SW, Holanda DM, Gao X, Park I, Yiannikouris A. Efficacy of a yeast cell wall extract to mitigate the effect of naturally co-occurring mycotoxins contaminating feed ingredients fed to young pigs: impact on gut health, microbiome, and growth. *Toxins.* (2019) 11:633. doi: 10.3390/toxins11110633
 47. Chen X, Naehrer K, Applegate T. Interactive effects of dietary protein concentration and aflatoxin B1 on performance, nutrient digestibility, and gut health in broiler chicks. *Poult Sci.* (2016) 95:1312–25. doi: 10.3382/ps/pew022
 48. Tejada-Castañeda Z, Avila-Gonzalez E, Casabon-Huguenin M, Cervantes-Olivares R, Vásquez-Peláez C, Hernández-Baumgarten E, et al. Biotransformation of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poult Sci.* (2008) 87:1569–76. doi: 10.3382/ps.2007-00304
 49. Alizadeh M, Rodriguez-Lecompte J, Rogiewicz A, Patterson R, Slominski B. Effect of yeast-derived products and distillers dried grains with solubles (DDGS) on growth performance, gut morphology, and gene expression of pattern recognition receptors and cytokines in broiler chickens. *Poult Sci.* (2016) 95:507–17. doi: 10.3382/ps/pev362
 50. Gill N, Wlodarska M, Finlay BB. Roadblocks in the gut: barriers to enteric infection. *Cell Microbiol.* (2011) 13:660–9. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01578.x
 51. Wu C, Gao Y, Li S, Huang X, Bao X, Wang J, et al. Modulation of intestinal epithelial permeability and mucin mRNA (MUC2, MUC5AC, and MUC5B) expression and protein secretion in Caco-2/HT29-MTX co-cultures exposed to aflatoxin M1, ochratoxin A, and zearalenone individually or collectively. *Toxicol Lett.* (2019) 309:1–9. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.03.010

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Hernández-Ramírez, Merino-Guzmán, Téllez-Isaías, Vázquez-Durán and Méndez-Albores. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.