

**LESIONES PANCREÁTICAS EN LECHONES DESTETADOS INDUCIDAS POR
INGESTIÓN DE ALIMENTO CONTAMINADO CON 100 PPB DE AFLATOXINA B1**

**Pancreatic Lesions in Weaned Piglets Induced by 100 ppb of
Aflatoxin B1 Contaminated Feed**

Elías J. Sogbe M.^{*,1}, Carmen T. Díaz^{*}, Elías Ascanio^{*}, Vitelio Utrera,
Héctor Zerpa^{*} y Oneyda J. Ramírez^{*}

^{*}Departamento de Patología Veterinaria. Facultad de Ciencias
Veterinarias. Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563.
Maracay 2101 A. Estado Aragua, Venezuela

Correo-E: elsoma@net-uno.net

Recibido: 29/03/05 - Aprobado: 27/04/06

RESUMEN

La contaminación de alimentos por hongos y micotoxinas ocurre en todas partes del mundo. La ingesta de micotoxinas, particularmente Aflatoxina B1 (AFB1) produce gran variedad de signos y daños orgánicos dependiendo de la edad, estado nutricional, dosis y duración de la exposición. La exposición crónica a bajas concentraciones de micotoxinas puede incrementar la susceptibilidad a adquirir otras enfermedades, pérdida de peso e ictericia; otros autores refieren daño hepático y renal. Existen escasas publicaciones reportando lesiones pancreáticas cuando se administran en el alimento 100 ppb o niveles menores de AFB1 en lechones destetados. En Venezuela no existen reportes de daño pancreático ocasionado por ingesta de niveles considerados bajos de AFB1 en el alimento. El presente trabajo se realizó en 16 lechones destetados de 4 semanas de edad, raza Yorkshire, divididos en dos grupos A: Control, B: tratados con alimento contaminado con 100 ppb de AFB1, durante 4 semanas se evaluaron signos clínicos, se tomaron muestras de sangre para estudio enzimológico pancreático y además se realizaron estudios macroscópicos e histopatológicos. El estudio macroscópico del páncreas mostró alteraciones significativas como focos de hemorragia y necrosis, el estudio histopatológico mostró signos de daño hepático: vacuolización difusa de hepatocitos y áreas de necrosis unicelular con proliferación ductal biliar para el final de la semana 4 en el grupo B, así como también pancreatitis necrotizante con hemorragia y proceso inflamatorio, mientras el Grupo Control no mostró lesiones. Por otra parte, las enzimas reveladoras de daño pancreático se mostraron incrementadas en el grupo B, mientras el Grupo A (Control) no presentó incremento de éstas. Este ensayo permite concluir que el uso de

alimento contaminado con 100 ppb de AFB1 puede explicar los daños pancreáticos descritos.

(**Palabras clave:** Cerdos, destete, consumo de piensos, aflatoxinas, Aragua)

ABSTRACT

The contamination of feed by fungi and mycotoxins happens anywhere in the World. The ingestion of mycotoxins particularly AFB1 by swines produce a great variety of clinical signs and organic injuries depending on the age, nutritional state, dose and duration of the exposition. The chronic exposition to low concentration can increase the susceptibility to other diseases, loss of weight, and icterus. Other researchers refer hepatic and kidney damage. There are few publications reporting pancreatic lesions when 100 ppb of AFB1 had been administered to weaned piglets. In Venezuela there are no previous reports of its pancreatic damage by AFB1 considered low levels in contaminated feeds. The present paper reports cases showing gross, microscopic aspects and pancreatic enzyme alterations in weaned piglets fed with 100 ppb AFB1 contaminated feed. 16 four weeks old weaned Yorkshire piglets of both sexes were used. The study was conducted in two groups (A, B). Group A as control, Group B fed on 100 ppb of AFB1. The trial was completed in four weeks. Piglets were euthanized two of each group by the end of every week. Clinical signs were evaluated, blood samples were taken and pancreatic enzymology studies were performed, in addition gross and histopathologic studies were performed. Gross findings showed in Group B: hemorrhage and necrotic foci in pancreas. Histopathologic findings showed early signs of liver damage as diffuse hepatic vacuolization and areas of unicellular necrosis and ductal biliar proliferation by the end of week 4 in the Group B., as well as focal necrotizing pancreatitis with hemorrhage and inflammatory process, while Group A (Control) showed no pancreatic lesions. On the other hand the pancreatic enzymes were increased only in group B. This trial allows to conclude that the use of 100 ppb AFB1 contaminated feed might explain the pancreatic damage above described.

(**Key words:** Swine, weaning, feed consumption, aflatoxins, Aragua)

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos heterocíclicos producidos en el almacenamiento de granos contaminados por hongos del género *Aspergillus*, particularmente *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Aún cuando mas de 18 diferentes aflatoxinas han sido identificadas, solamente Aflatoxina B1 (AFB1), B2, G1 y G2, han sido detectadas como contaminantes de alimentos como harina de maíz, arroz y otros cereales (Vasanthi y Bath, 1998).

Los productores de todo el planeta son víctimas de los efectos adversos de AFB1, de allí que ésta ha sido objeto de numerosas investigaciones, estudiándose las alteraciones clínicas y los cambios morfológicos producidos en

los órganos de los animales que han consumido alimento contaminado (Hsieh, 1987; Dilkin *et al.*, 2003).

Las descripciones de estos trabajos en Venezuela se refieren a contaminación de vegetales y de materias primas de alimento balanceado para ingesta animal. (Silvestre, 1985; Mazzani, 1988; Martínez *et al.*, 1993). Reportes que se aboquen al estudio morfológico en cerdos, han sido referidos por varios autores (Sogbe y Utrera, 1992; Díaz, 1993; Ascanio y Díaz, 1998; Sogbe *et al.*, 2004), la mayoría de ellos le dan prioridad a los daños hepáticos y renales observados cuando los animales consumen alimentos contaminados con elevados niveles de AFB₁ (Beasley, 2001). Es interesante señalar que existen escasos reportes en la literatura de la acción injuriente de AFB₁ sobre la arquitectura del páncreas en suinos (Ascanio y Díaz, 1998).

Dada la importancia de la especie porcina como rubro alimentario y el impacto económico que ocasionan las micotoxinas en los productores de cerdos en el país, se establecieron como objetivos en el presente trabajo:

1. Estudiar los hallazgos clínicos, toxicológicos, anatomopatológicos y enzimológicos cuando se administran niveles bajos de AFB₁ (100 ppb) a lechones destetados durante cuatro semanas.

2. Observar las alteraciones histopatológicas y enzimológicas pancreáticas que se suceden con la administración de los mencionados niveles de AFB₁ y relacionarlas con las observadas en un órgano blanco como el hígado.

3. Establecer, con base a los resultados experimentales obtenidos, un cuerpo de recomendaciones y un diagnóstico presuntivo y precoz de la aflatoxicosis a dosis bajas (100 ppb).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del tiempo y área experimental

Durante los meses de enero a julio de 2004, se realizó el ensayo en una granja porcina del estado Aragua. El ensayo se realizó durante 4 semanas.

Población y muestra

El estudio fue conducido en 2 grupos (A,B), se utilizaron 16 lechones destetados de raza Yorkshire de ambos sexos, el grupo A fue considerado control, el grupo B fue alimentado con alimento contaminado con 100 ppb de AFB₁.

Fase de Campo

Durante 4 semanas, se evaluaron signos clínicos, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular colectadas en tubos Vacutainer® con y sin anticoagulante.

Estudio clínico. Se evaluó la condición corporal y parámetros vitales de los lechones.

Fase de Laboratorio

Estudio enzimático. A partir de las muestras de sangre, se realizó el estudio de actividad de enzimas reveladoras de daño hepático y pancreático (transaminasas glutámica, pirúvica y amilasa pancreática: SGOT, SGPT, alfa amilasa, siguiendo técnicas de Analizador Biochemical analyser, Technicon RA-

100, usando Kit comerciales (Karmen, 1955; Tonka, 1970; Meyer y Harvey, 2000).

Estudio Anatomopatológico. Los lechones fueron sometidos a eutanasia, 2 lechones por cada grupo al final de cada semana, efectuándose el estudio macroscópico de los lechones. La evaluación se realizó mediante métodos de inspección ocular, palpación e incisión de los órganos, registrándose los hallazgos macroscópicos más relevantes. Las necropsias fueron realizadas en la Cátedra de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela (FCV/UCV). Se tomaron muestras de órganos tanto del grupo control (A), así como de las lesiones con mayor representatividad de los órganos lesionados del grupo (B), se fijaron en formalina bufferada al 10%, en una proporción 1:10 muestra fijador, luego fueron enviadas al laboratorio de Anatomía Patológica de la FCV de la UCV para su posterior deshidratación e inclusión en parafina, obteniéndose secciones histológicas de 5 a 6 micras de los tejidos. Posteriormente fueron coloreadas con Hematoxilina-Eosina (H-E), tricrómica de Gomory y reacción del ácido periódico de Schiff, según técnicas convencionales (Luna, 1968; Sheenan, 1973). Luego fueron estudiadas siguiendo los criterios anatomopatológicos en un microscopio óptico. Los casos más representativos se registraron y fotografiaron.

Estudio toxicológico

Se realizaron los estudios toxicológicos del alimento concentrado consumido por los animales. Para tal fin se tomaron 5 muestras de diferentes partes de los comederos ubicados en el área ocupada por los cerdos, tomado de los extremos y del centro de cada uno de ellos 200 gramos, con la finalidad de comprobar la ausencia de AFB1 en los casos controles y de la estabilidad de los niveles de AFB1 suministrado en los casos tratados. Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel, sin aire residual y remitidas refrigeradas al laboratorio de Toxicología de la FCV de la UCV, para proceder a realizar las determinaciones de AFB1, para ello se utilizó el método de minicolumna de Velasco y cromatografía de capa fina, siguiendo técnicas de Oficial Methods of Analisis of Association Chemists (A.O.A.C). Posteriormente fueron sometidas a la acción de ácido sulfúrico para su verificación. Oficial Methods of American Association Analysis Chemistry (1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio Clínico

La evaluación de los signos clínicos y comportamiento de los animales no mostraron diferencias entre los dos grupos estudiados (A, B), de hecho no hubo cambios clínicos en la evolución del ensayo y mostraron buen estado físico y de carnes, obteniendo un peso acorde con su edad.

En la Tabla 1 se puede observar la evolución del peso corporal promedio de los lechones de cada grupo para el final de cada semana del ensayo, allí se puede notar la diferencia entre los 2 grupos evaluados, con mayor peso en los animales que ingerían alimento no contaminado (Grupo A). No obstante el consumo de alimento se mantuvo homogéneo en ambos grupos A y B

(aproximadamente los lechones ingirieron el 3% de su peso/día). Esto parece indicar que si bien el consumo de alimento se mantuvo homogéneo, la capacidad de digestión/absorción de nutrientes estaba afectada en el grupo tratado con 100 ppb de AFB1, lo cual explicaría la diferencia de peso señalada que indica menor ganancia en los cerdos del grupo B.

Los signos clínicos observados fueron coincidentes con los señalados para la administración de AFB1 en esos niveles en la literatura (Sogbe y Utrera, 1992; Díaz, 1993).

Estudio macroscópico

El aspecto macroscópico de las vísceras realizado durante la necropsia reveló que los lechones del Grupo A no mostraron lesiones pancreáticas ni alteraciones en el resto de los órganos. En el Grupo B hemorragias en tejido muscular estriado, riñones, hígado y bazo, cuadros neumónicos y entéricos moderados, así como también focos hemorrágicos y necróticos en páncreas. Los hallazgos macroscópicos señalados han sido reportados por otros autores, pero con niveles superiores de AFB1 a los utilizados en este ensayo (Hsieh, 1987; Sogbe *et al.*, 2004).

Estudio microscópico

Las evaluaciones histopatológicas mostraron para la semana 4, en el 100% de los casos:

-Los Lechones del Grupo (A) no mostraron lesiones (Figuras 1 y 3).

-Los lechones del Grupo (B) mostraron en páncreas, edema de los acinos, focos congestivos y hemorrágicos y áreas de necrosis del parénquima, estos hallazgos solo se manifestaron en 100% al final de la cuarta semana de tratamiento con AFB1 (Figura 2), los hígados eran congestivos, con plétora sinusoidal, vacuolización difusa de hepatocitos y microfocos de necrosis unicelular en el área periférica del lobulillo, con signos de proliferación del epitelio ductal biliar, estos hallazgos se mostraron más evidentes en los lechones del grupo B, después de la segunda semana de tratamiento hasta el final de la cuarta semana (Figura 4).

Los hallazgos microscópicos observados en hígado son coincidentes con los reportados en la literatura tanto en cerdos como en otras especies tales como aves, después de 28 días de intoxicación experimental, no se observaron diferencias dependientes del sexo en este ensayo, a diferencia de lo señalado por otros autores. Dilkin *et al.* (2003) quienes utilizando 50 ppb de AFB1 en el alimento asociado a 30 ppb de Fumonisina B1 (FB1) evidenciaron mayor grado de lesiones en hembras. Es posible que ésto pudiera ser explicado, por el reducido número de lechones de que constó este ensayo y/o a la interacción con otra micotoxina (FB1) en el ensayo referido, lo cual pudo haber interactuado con AFB1.

Los lechones del Grupo (A) no mostraron alteraciones histológicas hepáticas ni pancreáticas, en este grupo los controles toxicológicos semanales realizados en el alimento siempre resultaron negativos para la determinación de micotoxinas.

Las alteraciones histológicas pancreáticas señaladas en este estudio fueron más evidentes en la tercera y cuarta semana del ensayo (21-28 días) en todos

los lechones estudiados del grupo B, sin embargo, ningún animal de este grupo falleció como consecuencia de la administración de 100 ppb de AFB1.

Estudio Enzimológico de lechones para la cuarta semana

El estudio de las enzimas reveladoras de daño hepático y pancreático es señalado en la Tabla 2.

La evaluación enzimológica al final de la cuarta semana del ensayo reveló: Incremento de las enzimas reveladoras de daño hepático (SGOT: 305/UI/ml, SGPT: 180 UI/ml. Valores normales: 40-120 UI/ml (Wilson *et al.*,1986; Sherwin, 1987).

-Las enzimas pancreáticas presentaron los siguientes niveles al final de la semana 4: Amilasa Pancreática: 975 UI/dl. Valor normal 60-180 UI/dl.

-Los lechones del grupo Control (A) no mostraron incremento de las enzimas estudiadas.

Estos hallazgos enzimáticos están acordes con lo señalado en la literatura Wilson *et al.*, 1986; según Boyd, 1988 y son perfectamente coincidentes con las lesiones histológicas descritas en los animales del grupo B.

CONCLUSIONES

Los aspectos clínicos, morfológicos y enzimológicos permiten señalar la importancia que tienen las alteraciones pancreáticas en la sucesión de trastornos que induce la AFB1 en el alimento cuando está contaminado con niveles supuestamente considerados bajos (Gimeno, 2000) y según la Federal Drug Administration (FDA), por la cual se rige la legislación venezolana, la cual acepta niveles de tolerancia de 20 ppb. FAO Corporate Document Requisitory, (2003).

En el estudio clínico y de evaluación del peso corporal de los animales de los dos grupos, se pudo apreciar una importante diferencia entre el peso promedio de los animales de ambos grupos, pudiéndose asumir que las alteraciones pancreáticas originan la autodigestión del parénquima explicando las lesiones vasculares y necróticas señaladas. Es importante considerar que el páncreas produce mas proteínas por gramo de parénquima funcional que cualquier otro órgano de la economía, principalmente en el componente acinar, cuya función es segregar gran variedad de enzimas, agua y electrolitos que vierten al duodeno, siendo la secreción de estas enzimas esenciales para la digestión y absorción de nutrientes que serán utilizados en el metabolismo intermediario (Boyd, 1988; Gabert *et al.*, 1999). De estas enzimas, las mas importantes son las lipolíticas y amilolíticas, siendo estas últimas utilizadas en la práctica clínica para diagnóstico de pancreatitis necrotizante, cuando sus valores en sangre son superiores a 60-180 UI/dl. Wilson, *et al.*,1986; Rinderkneton, 1993, razón por la cual se implementó su determinación en este ensayo. Esta lesión condiciona un déficit en la degradación de los azúcares y por otra parte de la producción de enzimas necesarias para la degradación-absorción de lípidos y de las vitaminas liposolubles (A;D;E;K) en el intestino, ocasionando con ello la producción de fenómenos hemorrágicos por falta de absorción de Vitamina K y probablemente trastornos en el metabolismo del Calcio que se corresponde con la necesidad de vitamina D, trastornos tróficos por malabsorción de vitamina A, y explicaría futuras fallas reproductivas donde tiene inherencia la vitamina E

. Adicionalmente, esta alteración en los procesos absorptivos de nutrientes ocasionada por la ausencia o disminución de los jugos pancreáticos en el lumen intestinal puede explicar la minusvalía ponderal de los cerdos del grupo B, aún manteniendo un nivel de ingesta similar al grupo control, el cual no presentó alteraciones macroscópicas, microscópicas ni enzimológicas. Las micotoxinas producen disminución de la síntesis de proteínas, lo que contribuye aún más a producir alteración en la síntesis de enzimas pancreáticas y digestivas

Lo anteriormente citado tiene un basamento morfológico en las lesiones histopatológicas señaladas en páncreas, que colaboran con las que muestra el hígado a producir una alteración sistémica, que aunque, subclínicas, tiene una importante expresión enzimológica como se puede ver de las enzimas evaluadas al final de la cuarta semana del ensayo. Es precisamente este aspecto, poco notable en la clínica de los lechones, lo que se traduce en importantes pérdidas en las granjas porcinas en el país.

De acuerdo a lo señalado supra, este ensayo permite concluir que la presencia de 100 ppb de AFB1 en alimento contaminado puede explicar los daños pancreáticos descritos y la sucesión de eventos patológicos que se producen.

REFERENCIAS

1. Ascanio, E.; Díaz, C.T. 1998. Estudio Bioproductivo Clinicopatológico y Toxicológico en Cerdos destetados, uso de un tripolímero sintético en la detoxificación de AFB1. Trabajo de Ascenso a Profesor Titular. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela, 217 p.
2. Beasley, V. 2001. Mycotoxins that affect liver. En: *Veterinary Toxicology, Mycotoxins*, Vol 30, No.9, p. 15, V. Beasley (Ed), Publisher I.V.I.S, Ithaca, New York, USA.
3. Boyd, J.W. 1988. Serum enzymes in the diagnosis of disease in man and animals. *J. Comp. Path.*, 98:381-396.
4. Díaz, C.T. 1993. Aflatoxicosis en lechones de una granja del estado Carabobo. Aspectos clínicos y de laboratorio. Trabajo de Ascenso. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela, 96 p.
5. Dilkin, P.; Zorete, P.; Malmann, C.A.; Gomes, J.D.F.; Eutiyama, C.; Oeting, L.L. Correa, B. 2003. Toxicological effects of chronic doses of AFB1 and FB1 weaned piglets. *Food Chem. Toxicol.*, 41:1345-1353.
6. FAO. 2003. Corporate Document Requisitory. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed.
7. Gabert, V.M.; Hedemann, M.S. 1999. The contribution of exocrine pancreas of fat digestion. En: *Biology of the pancreas of growing animals*. pp.339-360. Elsener Science BV., Amsterdam. The Netherlands.
8. Gimeno, A. 2000. Reglamentaciones para algunas micotoxinas en la alimentación humana y animal. Curso de Micotoxinas. Miami, Florida, U.S.A.

9. Hsieh, D.P. 1987. Mode of action of Mycotoxins. En: Krog, P. 9a. Ed. Mycotoxins in food. London academic Press. pp.149-176.
10. Karmen, A. 1955. Oxalate Transaminase. *J. Clin. Invest.*, 34:131-134.
11. Luna, L.G. 1968. Manual of histological staining methods of Armed Force. Institute of Pathology. 3a.Ed. Mc.Graw Hill Book Company, New York. U.S.A, 33 p.
12. Martínez, A.; Eng, C.Y.; Park, D. 1993. Descontaminación de maíz contaminado con aflatoxinas por el proceso de amoniación. *Acta Científica Venezolana.*, 44 (Sup.1), 308 p.
13. Mazzani, C. 1988. Hongos asociados a granos de sorgo almacenados en Venezuela y su control con propionato de amonio en el laboratorio. *Fisiopatol. Venez.*, pp. 15-17.
14. Meyer, D.J.; Harvey, J.W. 2000. El Laboratorio en Medicina Veterinaria. Interpretación y diagnóstico. 2nd. Ed., Edición Inter-Médica, Buenos Aires. Argentina.
15. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. 1990. Natural Poisons, 15th Ed. A.O.A.C. secretary .49. (Peter M.Scott Associate Chapter Editor) pp. 1184-1213.
16. Rinderknecht, M. 1993. Pancreatic secretory enzymes. En: V.L.W. Go *et al.* Ed. The pancreas: Biology Pathobiology and Disease. Raven Press, New York, U.S.A, pp. 219-251.
17. Sheenan, D.C. 1973. Theory and practice of histotechnology. The C.V. Mosby Co. Saint Louis. U.S.A., pp. 75-140 p.
18. Sherwin, J.E. 1987. Liver Function. En Clinical Chemistry. Ed. A.J. Pesce and L.A. Kaplan. Mosby Co., pp. 420-438.
19. Silvestre, R. 1985. Observaciones preliminares sobre incidencias de aflatoxinas en alimentos para suinos. *Rev. Fac. Cs. Vet. UCV.*, 32:163-169.
20. Sogbe, E.J.; Utrera, V. 1992. Clinical and anatomopathological evaluation of Aflatoxicoses in swine in Venezuela. En: Proceeding 12th. IPVS Congress. The Hague. The Netherlands. 664 p.
21. Sogbe, E.J.; Díaz, C.T.; Ascanio, E.; and Utrera, V. 2004. Pancreatic lesions in Venezuelan weaned piglets induced by 100 ppb AFB1 contaminated feed. En: Proceeding 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany. 762 p.
22. Tonka, D.B. 1970. Quality Control in Clinical Laboratories. Diagnostic Reagent Division. Ontario. Canada.
23. Vasanthi, S.; Bath, R.V. 1998. Mycotoxins in food occurrence, health & economic significance & food control measures. *Indian Med. Res.*, 108:212-214.
24. Wilson, E.A.; Cumberland, P.A.; Green, R.A. 1986. Chemistry reference values for domestic animals. *South. Vet.*, 37:125-127.

Tabla 1. Peso corporal promedio de lechones para el final de cada semana (g)

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Grupo A (control)	9.360	10.600	17.000	22.000
Grupo B (+100 ppb)	8.860	10.800	16.300	16.300

Tabla 2. Niveles enzimáticos de los lechones para el final de la semana 4 (UI)

	SGOT (UI/mL)	SGPT (UI/mL)	AMILASA (UI/DI.)
Grupo A (control)	125	67	500
Grupo B (+100 ppb)	305	185	975

Lista de Figuras:

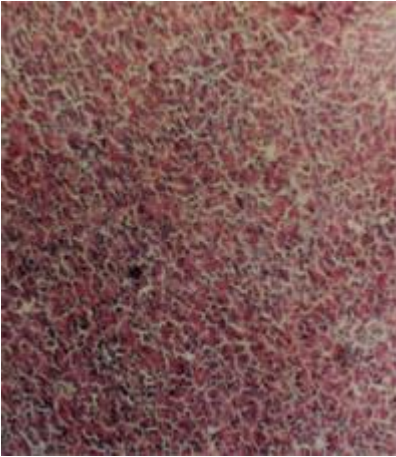


Figura 1. Micrografía de páncreas, Grupo Control (A): muestra arquitectura acinar conservada. H&E 155x

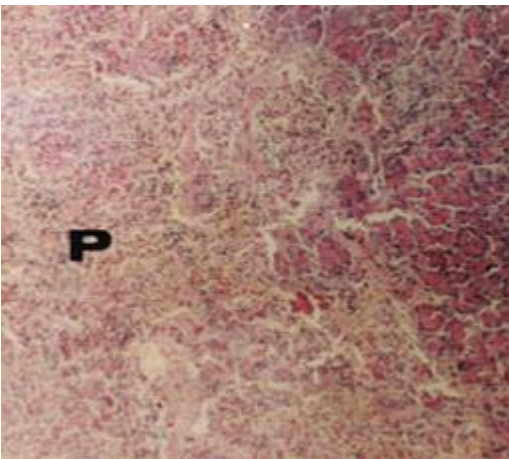


Figura 2. Micrografía de páncreas, Grupo tratado 100 ppb AFB1 (B): Permite apreciar necrosis acinar con proceso inflamatorio (P). H&E 155x



Figura 3. Micrografía de hígado, Grupo Control (A): muestra arquitectura lobulillar conservada. H&E 155x.

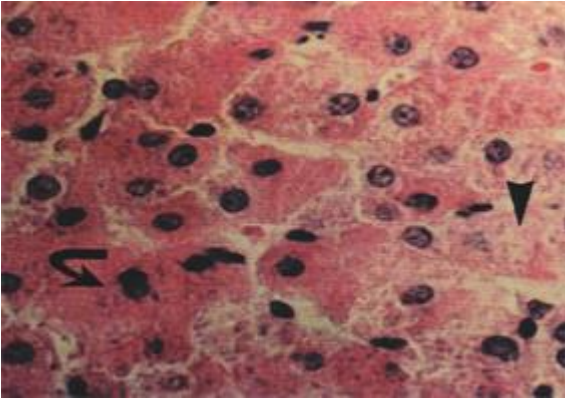


Figura 4. Micrografía de hígado, Grupo tratado 100 ppb AFB1 (B): muestra eosinofilia del citoplasma de los hepatocitos (Flecha curva), picnosis y .necrosis unicelular con cariólisis (punta de flecha). H&E 640x.