
Alteraciones histológicas hepáticas e incremento de proteínas séricas en pollos de engorde alimentados con dietas suplementadas con *Saccharomyces cerevisiae*.

Darwain Arrieta-Mendoza¹, Maria L. Perez-Arevalo², Amelia Luengo²,
Juan P. Hernández³, Deisy Lista-Alves¹ y Jesús Mosquera⁴.

¹Cátedra de Farmacología y Toxicología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.

³Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.

⁴Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette", Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: darwain@yahoo.com

Palabras clave: Hígado, *Saccharomyces cerevisiae*, hepatotoxicidad, fibrosis, pollo.

Resumen. El presente estudio fue realizado para determinar el efecto del alimento suplementado con cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (SC), sobre la morfología hepática, las actividad sérica de la aspartatoaminotransferasa (AST) y la alaninoaminotransferasa (ALT), la concentración de proteínas totales (PT), la albúmina, y las fracciones α , β y γ de las globulinas, en pollos de engorde. Se utilizaron dos grupos de pollos Hubbar x Hubbar (n = 16 cada uno), que recibieron la dieta T₁ (alimento comercial sin SC) y la dieta T₂ (alimento comercial con 0,1% de SC) durante 42 días. Se obtuvieron muestras de suero sanguíneo y de hígado, para los estudios. No se observó cambios macroscópicos, ni variación significativa del peso hepático relativo. Microscópicamente se evidenció mayor porcentaje (P < 0,05) de lesiones hepatotóxicas con proliferación/dilatación de conductos biliares y alto grado de vacuolización en pollos del grupo T₂. La tinción tricrómica demostró mayor grado de fibrosis perivascular en T₂. La ultraestructura del T₂ reveló células semejantes a fibroblastos, abundantes fibras de colágeno, vacuolización y alteración de la matriz citoplasmática de hepatocitos, ruptura celular y edema mitocondrial. A nivel sanguíneo, no se detectó diferencia en los valores de AST y ALT. Se apreció aumento de las PT, disminución de la albúmina y aumento de las glo-

bulinas (α_2 , β y γ) a los 42 días de experimentación. Estos hallazgos indican probables alteraciones hepáticas por consumo del SC, existiendo el posible riesgo de agravarlas, cuando se prolongue la exposición a esta dieta a las aves de corral.

Histological alterations in the liver and increased serum proteins in chickens fed with diet containing *Saccharomyces cerevisiae*.

Invest Clin 2007; 48(4): 431 - 443

Key words: Liver, *Saccharomyces cerevisiae*, hepatotoxicity, fibrosis, chicken.

Abstract. The aim of this study was to determine the effect of diet supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* (SC), on the liver morphology, serum activities of aspartateaminotrasferase (AST) and alanineaminotrasferase (ALT), and the serum concentration of total proteins, albumin and the different fractions (α , β , γ) of globulin in chickens. Two groups of Hubbar x Hubbar strain chickens (each = 16), were fed with a diet T₁ (commercial food without SC) and T₂ (commercial food with SC) for 42 days. Thereafter, animals were sacrificed and samples of blood and liver were obtained. Macroscopic features and relative weight of livers remained in the normal ranges in both groups. High percent of T₂ chickens ($p < 0.05$) showed hepatic alterations with proliferation/dilation of biliary ducts and increased degree of vacuolization. Tricromic stain showed elevated perivascular fibrosis in T₂. The ultrastructural study showed fibroblast like cells, increased amount of collagen fibers, cytoplasm vacuolization of hepatocytes and loss of cellular and mitochondrial integrates. No significant differences were observed in the activities of AST and ALT between groups. Increased concentrations of total proteins and α_2 , β and γ globulins and decreased albumin were observed in the serum of T₂ group. These findings may be related to a hepatotoxic effect of SC and chickens could have the risk of further increased hepatic failure with a prolonged exposition to this diet.

Recibido: 06-09-2006. Aceptado: 15-02-2007.

INTRODUCCIÓN

La levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) es frecuentemente utilizada en la industria de los alimentos destinados a consumo humano y en nutrición animal, destacando la cepa 1026 por sus beneficios zootécnicos (1). En avicultura existen frecuentes ensayos que incluyen el uso de SC en la dieta, principalmente como promotor de

crecimiento (2), probiótico (3) y adsorbente de micotoxinas (4, 5). Varios de estos efectos son debidos a los componentes de su pared celular (6-8) a los que también se les atribuyen propiedades inmunomoduladoras (9, 10), principalmente por incrementar los niveles de anticuerpos en aves (11-13). Algunos de los mecanismos para inducir estos efectos aún no están claros (6, 14).

Recientemente se ha asociado la presencia de anticuerpos anti-SC en algunas patologías hepáticas en el humano, principalmente la cirrosis hepatobiliar primaria autoinmune (15), lo que ha incluido a esta levadura en la lista de los probables agentes relacionados con la patogénesis de esta enfermedad y otras alteraciones idiopáticas asociadas con trastornos gastrointestinales (16, 17). El uso de dietas con SC o de los componentes de su pared celular en aves de corral, ha sido dirigido para valorar los índices productivos, inmunidad humoral, equilibrio en la microflora gastrointestinal, morfología de órganos y valores de química sanguínea entre otros parámetros (5, 10, 13, 18, 19); sin embargo, existe escasa información acerca de los cambios adversos en la morfología y la función hepática de estas aves. Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue evaluar la morfología hepática, la actividad sérica de aspartato-amino-transferasa (AST) y alanino-aminotransferasa (ALT), así como, las proteínas totales, la albúmina, y las fracciones séricas (α , β y γ) de las globulinas en pollos de engorde alimentados con dietas con o sin SC durante 42 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aves

Se utilizaron 32 pollos híbridos (Hubbar x Hubbar), machos, de un día de edad, procedentes de una incubadora comercial, seleccionados y vacunados contra las enfermedades de Marek (Virus de Herpes del Pavo), Gumboro (cepa intermedia) y Newcastle (Cepa La Sota) y revacunados a los 7 y 16 días de edad contra Gumboro y Newcastle. Las aves fueron pesadas y distribuidas en corrales de tres metros cuadrados cada uno, a razón de 5 aves/m². El piso fue cubierto con concha de arroz previamente fumigada sobre la cual se ubicaron los corrales y donde permanecieron las aves du-

rante 42 días. Se comenzó en la primera semana con criadoras, agua y alimento administrados *ad libitum*. El experimento se realizó en el Centro Experimental de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, en el Municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela; zona clasificada como bosque seco tropical, con temperatura promedio de 30°C.

Protocolo

Las aves fueron separadas en dos grupos de 16 animales cada uno (T₁ y T₂). Al grupo T₁ se le alimentó diariamente durante 42 días, con una dieta comercial y al grupo T₂ con la misma dieta comercial suplementada con cultivo de SC. En el último día los animales de cada grupo fueron sacrificados para la obtención de sangre y tejido hepático. El cálculo del tamaño de la muestra se determinó mediante la distribución no central de *F* (20).

Alimento (dieta comercial)

El alimento de la dieta control utilizado para este experimento fue producido en una fábrica de alimento comercial (Nutrientes de Occidente C.A, NUTRIDICA, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela), a base de maíz, sorgo venezolano y harina de soya, libre de aflatoxinas (21). Se emplearon dos tipos de alimentos balanceados en el ensayo: iniciador (proteína: 23,2%; grasa: 8,4%; fibra: 2,8%; energía metabolizable EM/kg MS: 3150 Kcal) que se ofreció a las aves desde el día 1 hasta el día 21 y el alimento finalizador (proteína: 19%; grasa: 10,5%; fibra: 2,9%; energía metabolizable EM/kg MS: 3000 Kcal) desde el día 22 al día 42 del experimento. Estos alimentos fueron elaborados en función de los requerimientos de la línea genética de los pollos de engorde y suplementados con aminoácidos, vitaminas y minerales bajo las formulaciones indicadas por el "National Research Council"

(22). En los 2 tipos de alimento los valores eataban calculados y en la energía metabolizable (EM/kg MS) los valores son tabulados. El cultivo de levaduras utilizado estuvo compuesto por células de la cepa 1026 de *S. cerevisiae*, liofilizado y microencapsulado en β -glucano para protegerlo y preservar su viabilidad. La levadura fue estandarizada a una concentración mínima de 5 billones de levaduras vivas por gramo, según las especificaciones descritas por entidades comerciales (Alltech® Corporate Headquarters, Kentucky, USA.). La dieta experimental con inclusión de esta levadura se hizo a razón de 0,1% del alimento balanceado según lo reportado por otros autores (2).

Análisis sanguíneos

La obtención de sangre para valores de química sanguínea se realizó mediante sangría por un corte con bisturí en la región cervical. La sangre se colectó en tubos de ensayo estériles sin anticoagulante para determinar la actividad sérica de AST y ALT (21) y las concentraciones de las proteínas séricas. Para medir las proteínas totales se utilizó una metodología previamente descrita (23). Las concentraciones séricas de albúmina y las fracciones de la globulina (globulina- α_1 , globulina- α_2 , globulina- β y globulina- γ), se determinaron mediante electroforesis (24).

Evaluación macroscópica y microscópica del hígado

Una vez obtenida la muestra de sangre, se realizó el sacrificio por dislocación cervical para hacer la evaluación macroscópica y microscópica del hígado. Luego de la necropsia se retiraron los hígados para calcular su peso relativo (5). También se tomaron porciones de cada hígado colocándolos en formalina al 10% tamponada, para el análisis histopatológico con hematoxilina y eosina (H&E). Los grados de severidad de las lesiones hepatotóxicas se clasificaron se-

gún Ortatatl y col. (25) de la siguiente manera: normal; lesión hepatotóxica leve (LHTL): hepatocitos con vacuolas lipídicas y/o hídricas, núcleos conservados o con escasa necrosis individual (ausencia de núcleos), sinusoides obliterados y escasos focos inflamatorios con predominio de linfocitos, con o sin fibrosis periportal/proliferación y dilatación de conductos biliares (FP/PDCB); lesión hepatotóxica moderada (LHTM): mayor número de hepatocitos con vacuolas lipídicas y/o hídricas con núcleos conservados y/o necrosis individual de hepatocitos (ausencia de núcleos), sinusoides obliterados e incremento de focos inflamatorios con linfocitos con o sin FP/PDCB. También se cuantificó el número de hepatocitos con núcleos piónóticos o condensados por mm² de tejido.

La intensidad de la vacuolización hepática en las muestras teñidas con H&E, se clasificó en 5 grados: ninguno/escasos hepatocitos vacuolados (+/-); hepatocitos con escasas vacuolas (+); hepatocitos con varias vacuolas intracitoplasmáticas (++); núcleos con escasas áreas de citoplasma (+++); núcleos sin citoplasma rodeados por espacios ópticamente vacíos (+++). La frecuencia de cada uno de estos grados se determinó por mm² de tejido. En aquellas muestras que resultaron con lesiones hepatotóxicas en T₂, se les realizó posteriormente la tinción tri-crómica con el fin de identificar incremento de tejido conectivo fibroso en los espacios perivasculares de los vasos sanguíneos hepáticos. Los diferentes grados histopatológicos se clasificaron de acuerdo a la intensidad y extensión del color azul en los espacios perivasculares observados. Así pues, la reacción azul parcial y de escasa intensidad representó el grado +/- y en la medida que el color azul cobró mayor intensidad y extensión se asignaron respectivamente los grados +, ++ y +++. La frecuencia en que se presentaron los distintos grados fue cuantificada según el nú-

mero de vasos sanguíneos con fibrosis perivascular por mm² de tejido. Las muestras con tinción tri-crómica de T₂ fueron comparadas con igual número de muestras tomadas al azar del grupo T₁.

Microscopía electrónica

Para realizar la microscopía electrónica se tomaron muestras de animales control (T₁) y animales alimentados con la dieta T₂ que presentaron lesiones hepáticas al estudio de microscopía de luz. Los estudios de microscopía se realizaron con el objeto de determinar las alteraciones ultraestructurales a nivel de mitocondrias, acumulación de fibras de colágeno y apoptosis. Se hicieron cortes de tejido hepático de aproximadamente 1 mm², y se incluyeron en glutaraldehído al 3% en buffer cacodilato de sodio 0,1M a 4°C. Las muestras posteriormente fueron deshidratadas post-fijadas en osmio e incluidas en Epon. Después de los cortes ultrafinos, las muestras fueron coloreadas con tetraóxido de plomo y citrato de uranilo. La observación se hizo en un microscopio electrónico de transmisión a 100.000 KV (JEM 1010, Japón).

Análisis estadístico

Los datos son presentados como la media \pm desviación estándar, y se utilizaron las siguientes pruebas estadísticas. Chi cua-

TABLA I
PESOS HEPÁTICOS RELATIVOS EN POLLOS DE ENGORDE TRATADOS CON ALIMENTO SUPLEMENTADO O NO CON 0,1% *Saccharomyces cerevisiae* DURANTE 42 DÍAS

Tratamiento	Peso hepático (g/100 g de peso vivo)
T ₁ (sin SC)	1,94 \pm 0,02
T ₂ (con SC)	2,01 \pm 0,05 ^a

SC: *Saccharomyces cerevisiae*. ^aValores sin significancia estadística.

drado (frecuencia de lesiones hepáticas, vacuolización, fibrosis perivascular) y prueba de Mann Whitney (peso hepático, actividad enzimática sérica, núcleos pícnóticos, proteínas séricas). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Estudios del tejido hepático

No se apreciaron alteraciones macroscópicas en hígado ni en la vesícula biliar en los grupos estudiados. El peso hepático relativo fue semejante en estos grupos (Tabla I). A nivel microscópico los análisis con H&E mostraron que el 12,5% de los animales del grupo T₁ presentaron lesiones hepatotóxicas leves mientras que el 50% del grupo T₂ presentó lesiones leves y moderadas ($P < 0,05$) (Tabla II). La intensidad de la

TABLA II
FRECUENCIA DE LESIONES HEPATOTÓXICAS EN HÍGADOS DE POLLOS DE ENGORDE TRATADOS CON ALIMENTO SUPLEMENTADO O NO CON 0,1% *Saccharomyces cerevisiae* DURANTE 42 DÍAS

Histología	T ₁ (sin SC)	T ₂ (con SC)	Número de muestras con FP/PDCB en T ₂
Normal	14/16	8/16	0
%	87,5	50	-
LHTL	2/16	6/16	2
%	12,5	37,5	-
LHTM	0	2/16	1
%	0	12,5	-

SC: *Saccharomyces cerevisiae*. LHTL: lesiones hepatotóxicas leves. LHTM: lesiones hepatotóxicas moderadas. FP/PDCB: fibrosis periportal/proliferación y dilatación de conductos biliares.

vacuolización del tejido hepático fue mayor, aunque no significativa, en el grupo tratado con alimento con SC. A este respecto, en el grupo T₁ (sin SC) fue más frecuente observar el grado +/- (ninguno o escasos hepatocitos vacuolados) comparado con el grupo T₂ (con SC) donde los grados ++ y +++ se presentaron en mayor frecuencia (Fig. 1). La diferencia entre los valores del número de núcleos picnóticos en ambos grupos no fue significativa (Fig. 2). La tinción trierómica mostró fibrosis perivascular en ambos grupos (T₁ y T₂). El grupo T₁ mostró fibrosis en grado de +/- y +, sin evidencia de los otros grados mientras que en el grupo T₂ mayormente se halló una intensidad de ++ y +++ (Fig. 3). La ultraestructura del grupo T₁ mostró hepatocitos que presentaban frecuentemente núcleos con aspecto normal de la cromatina, y citoplasma sin alteraciones visibles. En el grupo T₂ frecuentemente se observaron hepatocitos con áreas de degeneración intracitoplasmá-

tica, vacuolización y mitocondrias edematizadas. Se observaron abundantes acúmulos de fibras de colágeno en el intersticio y presencia de células parecidas a fibroblastos. Se evidenció la presencia de vacuolas lipídicas en el citoplasma del hepatocito y otras células hepáticas. Tanto en el grupo T₁ como el T₂ se apreciaron células con morfología sugerente de apoptosis (Fig. 4).

Valores sanguíneos

Los valores de actividad de las enzimas hepáticas en el suero se observan en la Tabla III. No se observó diferencia significativa en la actividad de estas enzimas en los grupos estudiados. En la evaluación de las concentraciones de proteínas séricas (Fig. 5) se evidenció aumento de las proteínas totales ($P = 0,04$), de las globulinas α_2 ($P < 0,0001$), β ($P = 0,04$) y γ ($P < 0,0001$), con disminución de la albúmina sérica ($P = 0,04$) en los animales del grupo T₂.

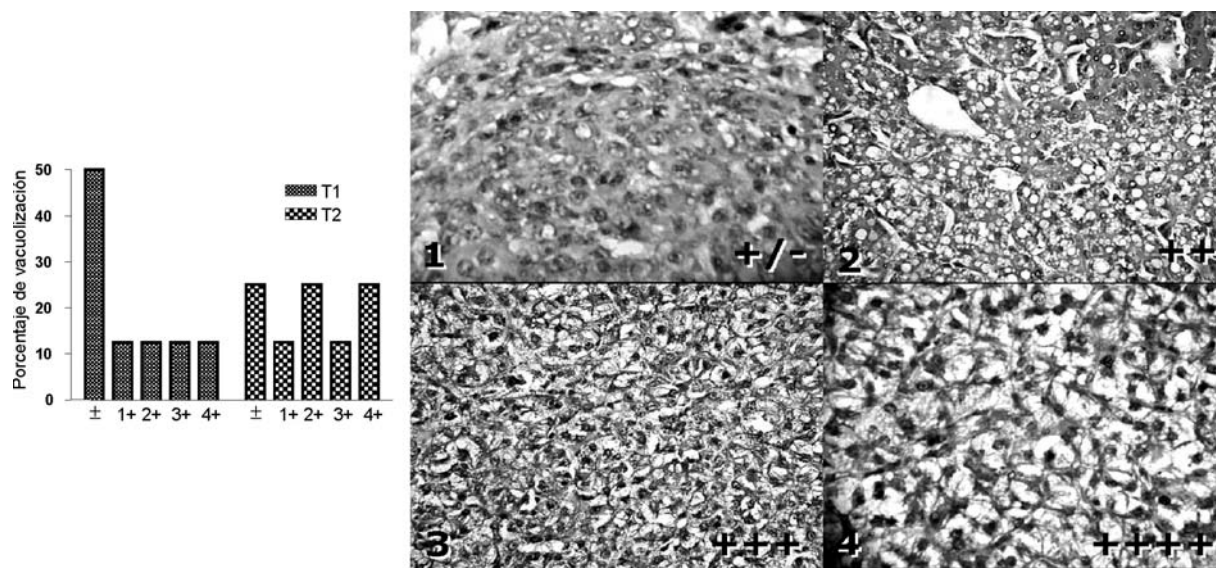


Fig. 1. Distribución del porcentaje de vacuolización hepática y su intensidad en pollos alimentados con la dieta T₁ (sin *S. cerevisiae*) y la dieta T₂ (con *S. cerevisiae*). En el diagrama de barras se observa mayor presencia de altos grados de vacuolización en los animales alimentados con la dieta T₂. Las microfotografías muestran secciones de tejidos hepáticos de animales con la dieta T₂ teñidos con hematoxilina y eosina mostrando un ejemplo de los diferentes grados de vacuolización (400X).

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio evidenciaron una frecuencia significativa de lesiones histopatológicas con incremento de la severidad de fibrosis perivascular y mayor intensidad de vacuolización hepática en animales alimentados con 0,1% de SC en la dieta durante 42 días. Estos hallazgos no estuvieron relacionados con alteraciones hepáticas macroscópicas, lo que sugiere un daño inicial a nivel microscópico sin liberación significativa de enzimas hepáticas por la ingestión de esta levadura. Las consecuencias de un proceso inflamatorio continuo y prolongado, induce consecutivamente daño tisular con muerte de células y la concomitante respuesta de remodelación y sustitución por fibras colágenas que integran el tejido conectivo fibroso. Estudios previos han demostrado que las patologías crónicas

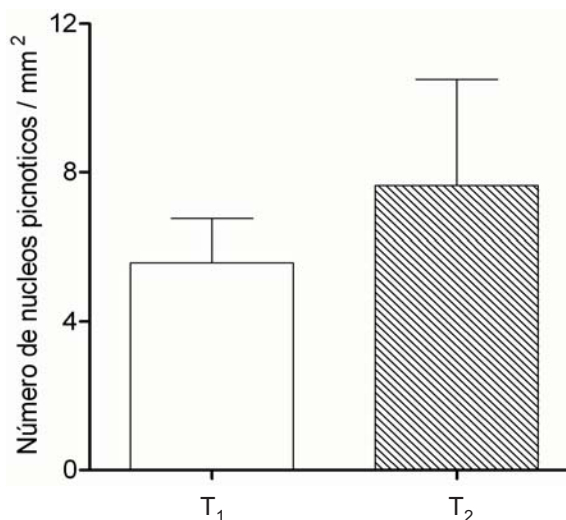


Fig. 2. Número de núcleos condensados o picnóticos en el tejido hepático de pollos alimentados con la dieta T₁ (sin *S. cerevisiae*) y la dieta T₂ (con *S. cerevisiae*).

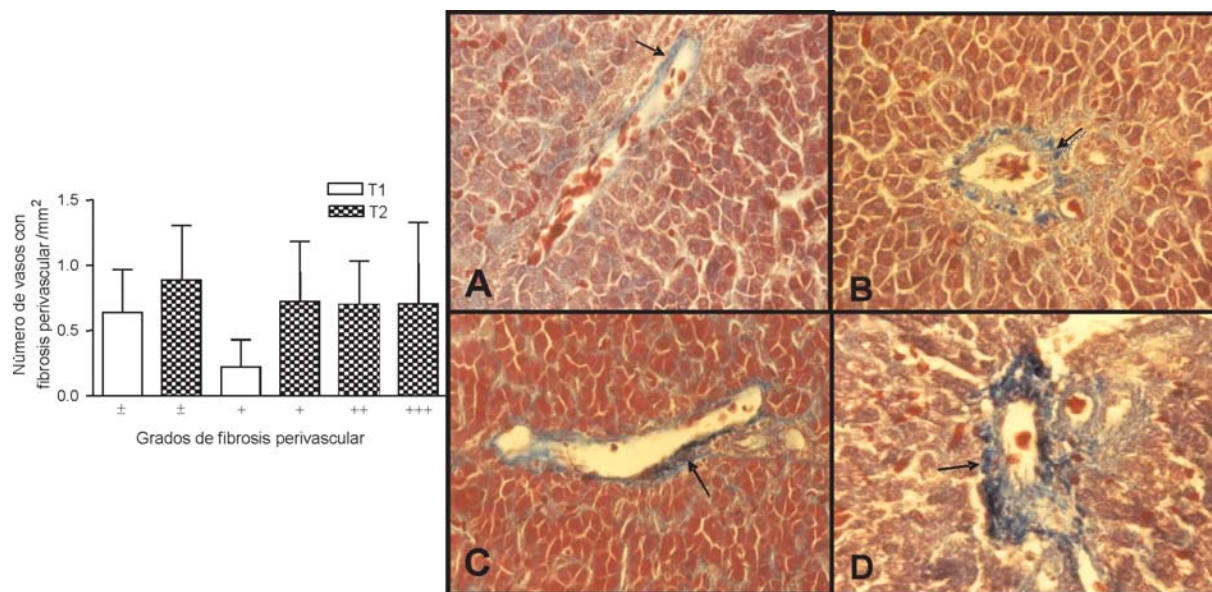


Fig. 3. Presencia de fibrosis perivascular hepática y su intensidad en pollos alimentados con la dieta T₁ (control) y la dieta T₂ (experimental). Se aprecia mayor número de vasos comprometidos y en mayor intensidad en los animales alimentados con la dieta T₂. Las microfotografías muestran secciones de tejidos hepáticos de animales con la dieta T₂ teñidos con la tinción de Masson (tricroómico). Las flechas señalan los sitios de fibrosis perivascular. A: ±; B: +; C: ++; D: +++ (400X).

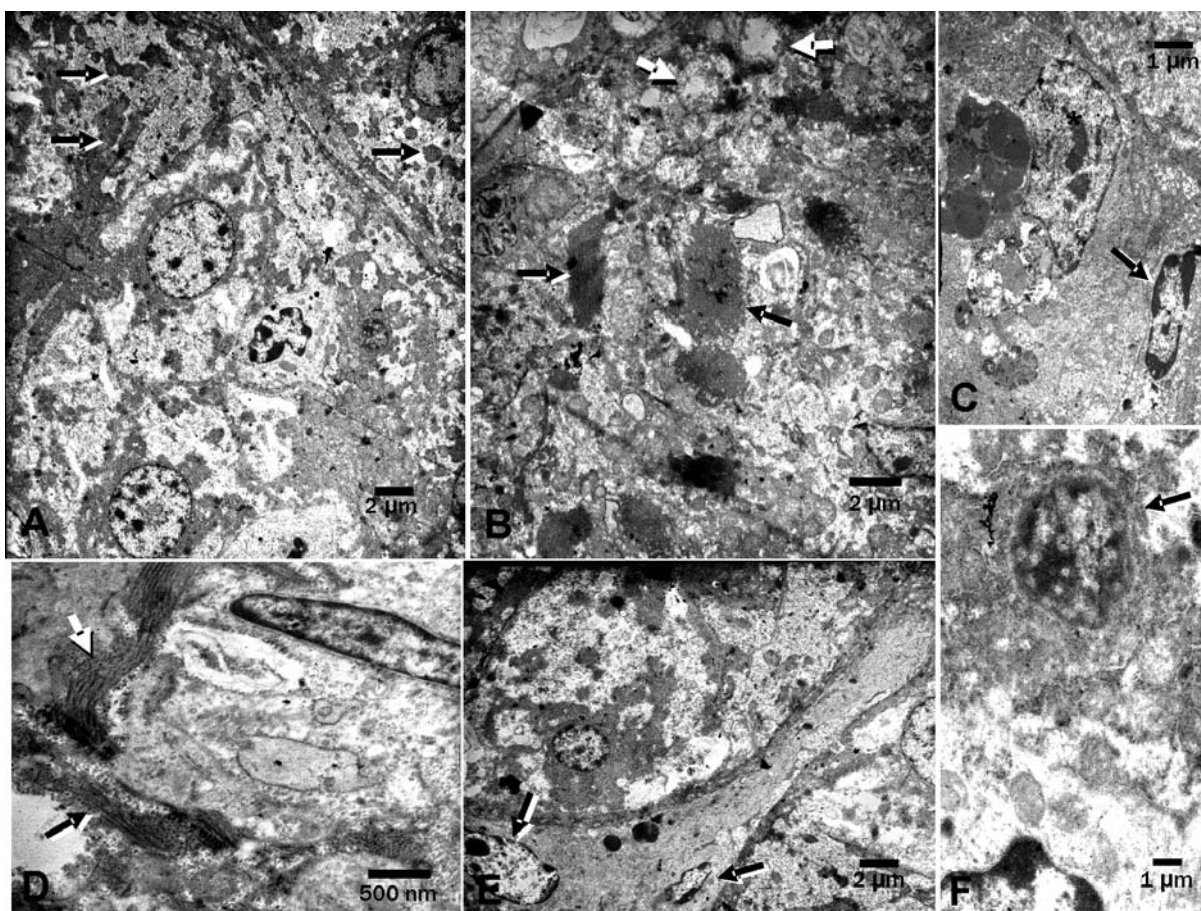


Fig. 4. Hallazgos ultraestructurales en el tejido hepático de pollos alimentados con la dieta T₂ (con *S. cerevisiae*). A) Se observa severa vacuolización de los hepatocitos con preservación de la morfología mitocondrial (flechas), 3000X. B) Zona de destrucción celular y dispersión de organelos, depositos de fibras de colágeno (flechas negras) y edema mitocondrial (flechas blancas), 4000 X. C) Se observa célula de Kupffer (asterisco) con abundante material fagocitado y una célula con características morfológicas de apoptosis (flecha), 8000X. D) Fibroblasto (célula de Ito), rodeado de fibras de colágeno (flechas), 15.000 X. E) Hepatocitos vacuolados separados por dos fibroblastos (flechas), 4000 X. F) Ampliación de un sector de la microfotografía A, donde se observa una célula con características morfológicas de apoptosis (flecha), 6000 X (aumento original).

TABLA III

ACTIVIDAD SÉRICA DE LA ASPARTATO-AMINOTRANSFERASA (AST)
Y ALANINO-AMINOTRANSFERASA (ALT) EN POLLOS DE ENGORDE TRATADOS CON ALIMENTO
SUPLEMENTADO O NO CON 0,1% *Saccharomyces cerevisiae* DURANTE 42 DÍAS

Tratamiento	Actividad enzimática (UI/L)	
	AST	ALT
T ₁ (sin SC)	243,21 ± 4,96	4,97 ± 0,37
T ₂ (con SC)	227,18 ± 2,48 ^b	5,35 ± 0,43 ^b

SC: *Saccharomyces cerevisiae*. ^bValores sin significancia estadística. UI/L: Unidades Internacionales/litro.

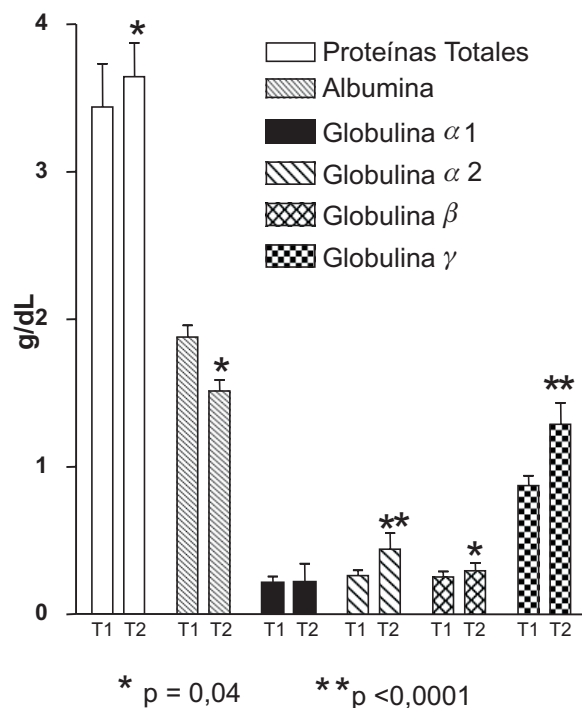


Fig. 5. Valores de varias proteínas en el suero de pollos alimentados con la dieta T₁ (sin *S. cerevisiae*) y la dieta T₂ (con *S. cerevisiae*). Se aprecia incremento significativo en las proteínas totales y las globulinas α_2 , β y γ , así mismo se observa disminución significativa de la albúmina sérica en el grupo T₂.

del hígado en el pollo cursan con alteraciones microscópicas como fibrosis perivascular, proliferación, dilatación de conductos biliares (26, 27), y con frecuencia formaciones de fibras colágenas adyacentes a células con abundantes vacuolas de lípido, semejantes a fibroblastos (células de Ito), importantes en la fibrogénesis tisular (28). Esto puede representar una respuesta común a la injuria hepática y puede relacionarse con los presentes hallazgos de fibrosis perivascular, vacuolización celular, mitocondrias edematizadas y acumulación de fibras de colágeno como resultado del daño hepático precedente.

En vista que los daños estructurales encontrados solo estuvieron acompañados

de una disminución de la producción de albúmina sérica, se podría interpretar que la levadura indujo daño hepático funcional con la concentración de SC usada en la dieta durante el periodo experimental. No obstante las aves sometidas a esta dieta no presentaron cambios significativos en las medias de los índices productivos evaluados a los 42 días (resultados no publicados), lo que indica que los efectos hepáticos observados, aparentemente fueron leves sin causar alteraciones importantes en los parámetros productivos durante el periodo de vida aproximado (42 días) de los pollos de engorde. Sin embargo, la intensidad de este daño podría agravarse, en aquellas aves de corral (reproductoras pesadas, gallinas ponedoras, pavos) suplementadas con SC en la dieta, donde los ciclos productivos tienen un periodo de tiempo mayor al de los pollos de engorde y el uso del SC sería más prolongado y sus efectos podrían tener consecuencias más severas.

La actividad sérica de AST en aves es considerada un indicador sensible de daño o disfunción hepatocelular (29, 30), debido a que la necrosis u otra alteración que aumente la permeabilidad celular, podría causar liberación e incremento inmediato de esta enzima en el suero (31). En el presente estudio la actividad de las enzimas ALT y AST se encontró similar al grupo control, lo que sugiere que no hubo suficiente daño celular hepático para incrementar estas enzimas, sin embargo, si hubo alteraciones en los niveles de proteínas totales y albúmina sérica. Estos resultados difieren de los reportados por Stanley y col. (5) en donde pollos que recibieron dietas con 0,1% de SC durante 28 días, no presentaron variación significativa en la actividad enzimática sérica de AST, proteínas totales y albúmina sérica, pero reportaron variación significativa en la actividad de ALT. A este respecto, trabajos con dietas suplementadas con componentes de la

pared celular de SC durante 35 días, tampoco detectaron variación significativa en los valores de proteínas totales, albúmina y actividad sérica de AST y ALT (6).

Algunos autores reportan que en casos de daño hepático crónico pueden producirse daños o ruptura hepatocelulares sutiles, pudiendo resultar en valores normales en la actividad sérica de AST y en algunos casos disminución de los mismos (32), en estos casos es común encontrar en aves hallazgos de fibrosis hepática con valores normales de AST, disminución de albúmina y otras proteínas (33). Estos hallazgos pudiesen estar en relación con los presentes resultados, en donde la fibrosis perivascular fue acompañada de disminución de la albúmina y puede representar el comienzo de una situación que pudiese agravarse más con la cronicidad de la exposición a la levadura (tratamiento por más de 42 días).

Otros parámetros hepáticos analizados fueron el peso relativo del órgano y la frecuencia de núcleos condensados (picnóticos) estos últimos sugierentes de apoptosis. Los resultados de los pesos hepáticos relativos del presente estudio coinciden con los de Stanley y col. (5), quienes utilizaron la misma concentración (0,1%) de SC en la dieta de pollos de engorde. Así mismo otros autores reportaron pesos hepáticos similares entre pollos de engorde sometidos a varios tipos de dietas suplementadas con SC (3). La comparación del número de núcleos picnóticos entre los dos grupos no presentó diferencia significativa, lo cual sugiere que la apoptosis no fue el mecanismo celular involucrado en la hepatotoxicidad detectada en aves que recibieron la dieta experimental. La presencia de células con núcleo condensado o picnótico, puede estar en relación con la presencia de células con morfología de apoptosis observadas en el tejido hepático con el microscopio electrónico (núcleos condensados, condensación citoplasmática, disminución del tamaño celu-

lar). El resto del examen histopatológico reveló mayor intensidad de vacuolización hepática, con una frecuencia significativa de lesiones hepatotóxicas y fibrosis perivascular, dichos hallazgos indican un probable efecto de la dieta con SC sobre el tejido hepático.

Durante este estudio se encontró un aumento significativo de las proteínas séricas totales en las aves del grupo experimental, sin embargo también se encontró una disminución de los niveles de albúmina. Este último hallazgo pudiese estar relacionado con la alteración en la función hepática que involucra la síntesis de albúmina como efecto de la dieta con SC. A este respecto, se ha reportado disminución de la síntesis de proteínas (principalmente albúmina) debido a patologías hepáticas (29). El incremento de las proteínas totales en los animales alimentados con la dieta más SC puede estar relacionado con el aumento de la producción de otras fracciones proteicas séricas como lo son las α y γ -globulinas encontradas incrementadas en este grupo de animales. La fracción de la γ -globulina es sintetizada principalmente por células originadas por el linfocito B (34).

El hallazgo de niveles elevados de γ -globulina en pollos suplementados con SC coincide con otros reportes del incremento significativo de inmunoglobulinas (Ig) séricas en aves sometidas a este tipo de dietas (2, 10) o con los componentes de la pared celular de esta levadura (9, 13, 35). Otros autores demostraron incremento significativo de IgG en suero y de IgA en bilis de pavos sometidos a dietas con componentes de la pared celular del *S. cerevisiae* (36). Así mismo, está demostrado que parte de las estructuras de la pared celular del *Saccharomyces*, tiene una potente actividad antigénica (37). El significado del aumento del contenido de γ -globulina sérica en este estudio, pudiera ser debido a un incremento en la producción de anticuerpos contra an-

tígenos de SC que pudiesen reaccionar con estructuras celulares orgánicas mediante una reacción cruzada y producir patología hepática o en otros órganos (16, 38). A este respecto, se ha reportado que en el pollo, 30 a 75% de la IgA producida en la pared intestinal, puede llegar por la sangre de la vena porta al hígado (34), sin embargo, existen escasos estudios en aves que puedan identificar patologías autoinmunes en pollos asociadas con la presencia de anticuerpos contra antígenos de SC, a diferencia de reportes de patología en humanos, tanto hepática (15, 39- 41), como en el tracto gastrointestinal (42, 43).

Los resultados provenientes de este estudio, sugieren que el consumo de SC en la dieta puede ser un riesgo de hepatotoxicidad para los pollos de engorde, al inducir alteraciones histológicas y funcionales del órgano. Además la ingestión de esta levadura estuvo relacionada con aumento de la concentración de γ -globulina sérica, que pudiese estar asociada a fenómenos de autoinmunidad. Se requieren estudios dirigidos a determinar, si la prolongación del tiempo de administración del SC en la dieta, pudiese determinar incremento en las lesiones reportadas y agravamiento de la disfunción hepática, así como determinar si el aumento de las γ -globulinas puede estar relacionado con la presencia de anticuerpos anti-SC y su posible papel en la inducción de autoinmunidad.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia. A la Unidad de Diálisis y Trasplante Renal del Hospital Universitario de Maracaibo por su asistencia técnica. Al Profesor Jorge Soto Bracho, Médico Veterinario Patólogo, del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario, por su participación en la descripción histopatológica.

REFERENCIAS

1. **Gómez BJ.** El papel de las levaduras en la era de los suplementos nutracéuticos y alimentos funcionales. Proceeding Alltech's 11^a Ronda Latinoamericana de Alltech, 2001. Nicholasville, Kentucky, USA. P. 59-66.
2. **Devegowda G, Aravind BIR, Rajendra K, Morton MG, Baburathna A, Sudarshan CA.** Biological approach to counteract aflatoxicosis in broiler chickens and ducklings by the use of *Saccharomyces cerevisiae* cultures added to feed. En: Lyons T P, Jacques K A, Eds. Proc. Alltech's 10th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry. Nottingham: University Press; 1994. P 235-245.
3. **Onifade AA, Odunsi AA, Babatunde GM, Olorede BR, Muma E.** Comparison of the supplemental effects of *Saccharomyces cerevisiae* and antibiotics in low-protein and high-fibre diets fed to broiler chickens. Arch Tierernahr 1999; 52:29-39.
4. **Devegowda G, Aravind BIR, Morton MG.** *Saccharomyces cerevisiae* and mannan-oligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. Proceedings of Australia Poultry Sciences Symposium, 1996. Sydney, Australia. p. 103-106.
5. **Stanley VG, Woldensenbet S, Hutchinson DH.** The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. Poult Sci 1993; 72:1867-1872.
6. **Raju MVLN, Devegowda G.** Influence of esterified-glucomanan on performance and organ morphology serum biochemistry and hematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). Br Poult Sci 2000; 41:640-650.
7. **Zaghini A, Roncada P, Anfossi L, Rizzi.** Aflatoxin B₁ oral administration to laying hens: effects on hepatic MFO activities and efficacy of a zeolite to prevent aflatoxicosis. Rev Med Vet 1998; 6:668-672.
8. **Zhang AW, Lee BD, Lee SK, Lee KW, An GH, Song KB, Lee CH.** Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell compo-

- nents on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poult Sci* 2005; 84:1015-1021.
9. **Cotter PF.** Modulation of the immune response: current perceptions and future prospects with an example from poultry. En: Lyons TP, Jacques KA, Eds. *Biotechnology in the Feed Industry* Nottingham. Nottingham: University Press; 1997. P 195-204.
 10. **Devegowda G, Aravind BIR, Morton MG.** Immunosuppression in poultry caused by aflatoxins and its alleviation by *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sacc¹⁰²⁶), and mannanoligosaccharides (Micosorb). En: Lyons T P, Jacques K A, Eds. *Biotechnology in the Feed Industry*. Nottingham: University Press; 1997. P 205-215.
 11. **Cotter PF, Malzone A, Paluch B, Lilburn MS, Sefton AE.** Modulation of humoral immunity in commercial laying hens by a dietary prebiotic (Abstract). *Poultry Science*, 2000. Menasha, Wisconsin. p 38.
 12. **Raju MVLN, Devegowda G.** Esterified-glucomannan in broiler chicken diets-contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: evaluation of its binding ability (in vitro) and efficacy as immunomodulator. *Asian Aust J Anim Sci* 2002; 15:1051-1056.
 13. **Shashidhara RG, Devegowda G.** Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. *Poult Sci* 2003; 82:1319-1325.
 14. **Aravind KL, Patil VS, Devegowda G, Umakantha B, Ganpule SP.** Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poult Sci* 2003; 82:571-576.
 15. **Muratori P, Muratori L, Guidi M, Maccariello S, Pappas G, Ferrari R, Gionchetti P, Campieri M, Bianchi FB.** Anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) and autoimmune liver diseases. *Clin Exp Immunol* 2003; 132:473-476.
 16. **Oshitani N, Hato F, Suzuki K, Sawa Y, Matsumoto T, Maeda K, Higuchi K, Kitagawa S, Arakawa T.** Cross-reactivity of yeast antigens in human colon and peripheral leukocytes. *J Pathol* 2003; 199: 361-367.
 17. **Van Den Bogaerde J, Kamm MA, Knight SC.** Immune sensitization to food, yeast and bacteria in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:1647-1653.
 18. **Bradley GL, Savage TF, Timm KI.** The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldarii on male poult performance and ileal morphology. *Poult Sci* 1994; 73:1766-1770.
 19. **Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE.** The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the cecal of salmonella-challenged broiler chicks. *Poult Sci* 2000; 79:205-211.
 20. **Martin FG.** *Statistical Design and Analysis*. University of Florida, Copy Center UF; 1995, p. 2-4-2-7.
 21. **Arrieta DM, Pérez AM, Gómez C, Molero G, Novoa E, Rincón H, Ascanio E.** Efecto del alimento contaminado con aflatoxina B₁ (0,07 mg/kg) sobre la morfología hepática y actividad enzimática sérica (AST y ALT) en pollos de engorde. *Rev Cientif FCV-LUZ* 2006; XVI:39-47.
 22. **National Research Council (NRC).** *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th Ed. Washington DC: National Academy Press; 1994, p 11-15.
 23. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
 24. **Ocando D, Rivera S, Ajjam E, Salas R.** Caracterización proteica del suero del ave *Coragyps atrtus* (Zamuro de Cabeza Negra) y algunos estudios inmunoserológicos. *Rev Cientif FCV-LUZ* 1991; I: 57-70.
 25. **Ortatatli M, Oguz H, Hatipoğlu F, Karaman M.** Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Res Vet Sci* 2005; 78: 61-68.
 26. **Ochiai K, Handharyani E, Umemura T.** Idiopathic hepatic fibrosis with cholestasis in broiler chickens: immunohistochemistry of hepatic stellate cells. *Avian Pathol* 2003; 32:425-428.

27. **Ochiai K, Handharyani E, Umemura T.** Idiopathic hepatic fibrosis with cholestasis in broiler chickens: immunohistochemistry of hepatic stellate cells. *Avian Pathol* 2002; 31:425-428.
28. **Handharyani E, Ochiai K, Iwata N, Umemura T.** Immunohistochemical and ultrastructural study of Ito cells (fat-storing cells) in response to extrahepatic bile duct ligation in broiler chickens. *J Vet Med Sci* 2001; 63:547-552.
29. **Jones PM.** *Avian Clinical Pathology*. *Vet Clin North Am* 1999; 2: 663-685.
30. **Kubena LF, Harvey RB, Bailey RH, Buckley SA, Rottinghaus GE.** Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poult Sci* 1998; 77:1502-1509.
31. **Shukla SK, Pachauri SP.** Blood biochemical profiles in induced aflatoxicosis of cockerels. *Br Poult Sci* 1995; 36:155-160.
32. **Fudge AM.** *Avian Liver and Gastrointestinal Testing*. En: Fudge A M, Ed. *Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets*; 2000. P 47- 55.
33. **Lumeij JT.** *Hepatology*. En: Ritchie B W, Harrison G J, Harrison L L, Eds. *Avian Medicine Principles and Application*. Lake Worth, Florida: Wingers Publications; 1997. P 275-280.
34. **Tizard IR.** *Inmunología Veterinaria*. 6^{ta} Ed. Mexico (DF): McGraw-Hill Interamericana; 2002, p 240-250.
35. **Cetin N, Guclu BK, Cetin E.** The effects of probiotic and mannanoligosaccharide on some haematological and immunological parameters in turkeys. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2005; 52:263-267.
36. **Savage TF, Cotter PF, Zakrzewska EI.** The effect of feeding a mannanoligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA of Wrolstad MW male turkeys. (Abstract) *Poultry Science*, 1996. Wisconsin, USA. p 34.
37. **Ballou CE.** A study of the immunochemistry of three yeast mannans. *J Biol Chem* 1970; 245:1197-1203.
38. **Teoh KL, Mackay IR, Rowley MJ, Fussey SP.** Enzyme inhibitory autoantibodies to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis differ for mammalian, yeast and bacterial enzymes: implications for molecular mimicry. *Hepatology* 1994; 19:1029-1033.
39. **Darroch CJ, Barnes RM, Dawson J.** Circulating antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers'/brewers' yeast) in gastrointestinal disease. *J Clin Pathol* 1999; 52: 47-53.
40. **Fussey SP, Lindsay JG, Fuller C, Perham RN, Dale S, James OF, Bassendine MF, Yeaman SJ.** Autoantibodies in primary biliary cirrhosis: analysis of reactivity against eukaryotic and prokaryotic 2-oxo acid dehydrogenase complexes. *Hepatology* 1991; 13:467-474.
41. **Reddy KR, Colombel JF, Poulain D, Krawitt EL.** Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in autoimmune liver disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:252-253.
42. **Barta Z, Csipo I, Szabo GG, Szegedi G.** Seroreactivity against *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and celiac disease. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2308-2312.
43. **Schwarze C, Terjung B, Lilienweiss P, Beuers U, Herzog V, Sauerbruch T, Spengler U.** IgA class antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis and autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 2003; 133(2):283-289.