

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS TOXICOS PRODUCIDOS POR
AFLATOXINAS SEGUN LA VIA DE INOCULACION
Y ESPECIE ANIMAL UTILIZADAS**

*Por Guillermo Suárez Fernández
Alfredo Escudero Díez
Santos Ovejero del Agua*

I. INTRODUCCION Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Los ensayos biológicos con aflatoxinas se efectúan, generalmente, como pruebas confirmatorias posteriores a su identificación química. El estudio de una aflatoxina en orden a su caracterización comprende una serie de pasos: extracción por un solvente polar, purificación del extracto, separación por cromatografía en capa fina y revelado químico o examen a la luz ultravioleta determinando el valor Rf. Este dato resulta característico pero precisa de una bioconfirmación.¹

El número de pruebas biológicas de diagnóstico propuestas a tal fin resulta ya bastante amplio, pero ninguna de ellas es rigurosamente específica. Se basan en la provocación de reacciones de toxicidad aguda o en poner de manifiesto una toxicidad genética de las aflatoxinas (su poder carcinogénico, teratogénico o mutagénico).²

Entre las pruebas que se basan en provocar una toxicidad aguda se incluyen las inoculaciones a patitos de un día, ratas, ratones y cobayos, en cuyos animales se producen lesiones de necrosis centrolobulillar, hepatitis periportal, hiperplasia de conductos biliares, hemorragia y procesos mitóticos celulares con aparición de células hepáticas de mayor tamaño.³

Resulta evidente que modificar una prueba biológica, de inoculación en animales de experimentación, en el sentido de una mayor especificidad sería extraordinariamente útil en el diagnóstico de las aflatoxicosis.⁴

En consecuencia con esta idea hemos planeado este estudio en el sentido de observar las reacciones hísticas de distintas especies de animales de experimentación, patitos de un día, rata blanca, ratón blanco y cobayo, concretamente, ante la inoculación de la aflatoxina B₁ por distintas vías.⁵

Se estima hoy en día que cerca de un 10 por cien de los compuestos químicos considerados como hepatocarcinogénicos producen alteraciones histopatológicas en el hígado de carácter similar a las aflatoxinas. De estos, las nitrosaminas y compuestos diazoicos se obtienen por síntesis, pero pueden encontrarse como cuerpos naturales en algunas plantas.⁶

Como quiera que estos compuestos difieren de las aflatoxinas en solubilidad y grado de toxicidad, hemos pensado en principio, que la inoculación en lotes diferentes de animales, por vía digestiva e intravenosa, y la comparación subsiguiente de resultados producidos por aflatoxinas y compuestos químicos de acción similar, podrían revelarnos la posibilidad o imposibilidad de incrementar la especificidad de este tipo de pruebas biológicas de diagnóstico.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. INOCULACIÓN DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La experimentación ha sido planteada sobre la base de empleo de dosis letales medias a las 72 horas, para cada especie, sacrificando los supervivientes a las 48 horas, para el correspondiente estudio histopatológico.

Se han comparado con la aflatoxina B₁, la más potente de las conocidas, dimetilnitrosamina en patipollos, rata blanca y cobayo. En ratón se utilizó el dimetilaminoazobenceno en lugar de nitrosamina, al comprobar la dificultad de producir lesiones hepáticas con este compuesto.

Tanto la aflatoxina B₁ Calbiochem cristalizada y finamente dividida (tamaño de partícula < 2 micras), como la dimetilnitrosamina y dimetilaminoazobenceno Merck, se administraron disueltas en propilenglicol, exento de toxicidad.

A partir del hígado de los animales sacrificados a las 48 horas, se realizaron preparaciones histológicas teñidas por los métodos de hematoxilina, Gallego y Sudan IV.

Los distintos lotes de animales de experimentación utilizados tenían el mismo origen, idéntico sexo y variaciones mínimas de peso. Disponían por tanto de un elevado grado de homogeneidad y se hallaban perfectamente controlados desde los puntos de vista nutricional e infectivo.

Las especies utilizadas en la experimentación fueron: patitos de un día, rata blanca, ratón blanco y cobayo. Cada especie y, utilizando individuos distintos integrantes de lotes homogéneos, fue *inoculada por dos vías diferentes* con cada producto, constituyendo esta técnica un punto clave en el planteamiento experimental, como se discutirá en su momento.

II.2. DOSIFICACIÓN Y VÍAS UTILIZADAS

Las dosis de aflatoxina suministradas y vías de inoculación fueron las siguientes:

Patitos de un día

Vías digestiva e intravenosa.

DL₅₀ = 25 microgramos por 50 g. de peso.

Rata blanca

Vías digestiva e intravenosa.

DL₅₀ = 10 mg. por kilo de peso.

Ratón blanco

Vías digestiva e intravenosa.

DL₅₀ = 10 mg. por kilo de peso.

En el caso de dimetilnitrosamina o dimetilaminoazobenceno se utilizaron dosis equivalentes a la citada DL₅₀ × 100.

Cobayo

Vías digestiva e intravenosa.

DL₅₀ = 1,4 mg. por Kg. de peso.

En patipollos, rata blanca y cobayo se inocularon el mismo número de lotes e individuos, con arreglo a la siguiente expresión:

- a) Aflatoxina B₁ Calbiochem por vía digestiva. Inoculados 18 animales distribuidos en tres lotes de seis. Un lote más, testigo.
- b) Aflatoxina B₁ Calbiochem por vía intravenosa. Inoculados 12 animales distribuidos en dos lotes de seis. Un lote más como testigo.
- c) Dimetilnitrosamina por vía digestiva. Inoculados 6 animales. Un lote de tres como testigo.
- d) Dimetilnitrosamina por vía intravenosa. Inoculados 6 animales. Un lote de tres como testigo.

En ratón blanco el protocolo fue diferente empleándose, comparativamente con la aflatoxina, dimetilaminoazobenceno.

- a) Aflatoxina B₁ Calbiochem por vía intravenosa. Inoculados 24 animales distribuidos en tres lotes. Lote de 8 como testigo.
- b) Aflatoxina B₁ Calbiochem por vía digestiva. Inoculados 16 animales distribuidos en dos lotes. Un lote de 8 como testigo.
- c) Dimetilaminoazobenceno por vía intravenosa. Inoculados 12 animales distribuidos en dos lotes. Un lote de 6 como testigo.
- d) Dimetilaminoazobenceno por vía digestiva. Inoculados 12 animales distribuidos en dos lotes. Un lote de 4 como testigo.

III. RESULTADOS

III.1. PATITOS DE UN DÍA

Los inoculados por vía digestiva con aflatoxina B₁, mostraban una típica degeneración grasa centrolobulillar (como puede apreciarse en las figuras números 1 al 3, inclusive). Por vía intravenosa se producía una degeneración grasa de carácter difuso en todo el parénquima hepático (fig. 4).

La inoculación de dimetilnitrosamina por ambas vías, digestiva e intravenosa, producía una congestión generalizada del hígado, pero no degeneración grasa.

III.2. RATA BLANCA

Por vía intravenosa produce una congestión con reacción angioblástica y degeneración celular (fig. 5). Por vía digestiva, una reacción angioblástica periportal menos manifiesta (fig. 6). Pero además, por esta vía se aprecian algunas otras lesiones que no se producen por vía intravenosa, como piconosis nuclear de las células centrolobulillares (fig. 7) e infiltrado pericolangiolar (fig. 8). Ahora bien, con dimetilnitrosamina se producen reacciones similares indistinguibles.

III.3. RATÓN BLANCO

Por vía digestiva se observa una abundante proliferación histiocitaria alrededor de los colangiolas (figs. 9 y 10).

Por vía intravenosa, la lesión predominante sigue siendo la misma aunque más intensa (fig. 11). Se observa, también por ambas vías, con cierta frecuencia, una hipertrfia de colangiolas (fig. 12) y únicamente en dos casos de 40 ratones inoculados, apareció una tumefacción turbia alrededor de un vaso del espacio porta (figuras 13 y 14).

Con dimetilaminoazobenceno se aprecian únicamente focos inflamatorios diseminados por el parénquima hepático, tanto por vía digestiva como intravenosa (figura 15).

III.4. COBAYO

Por vía digestiva (técnica siempre difícil por la facilidad con que se perfora el esófago) se produce una degeneración grasa centrolobulillar que no afecta, o muy débilmente, a los espacios porta, como puede observarse en la preparación (figs. 16 y 17) teñidas con Sudán IV. Cuando se realiza la inoculación por vía intravenosa sucede lo contrario: son los espacios porta los que se encuentran particularmente afectados por la degeneración grasa (fig. 18), en tanto que en el centro del lobulillo hepático esta alteración es prácticamente nula (fig. 19).

Otras lesiones, como infiltración de células redondas en torno a capilares biliares (fig. 20) o de hiperplasia de células de Kupffer (fig. 21), se observaron en una pequeña proporción de individuos (2 de 12), por lo que no resulta aconsejable generalizar los resultados.

Con dimetilnitrosamina se producía fácilmente la degeneración grasa tanto por una vía como por la otra, pero siempre con un carácter difuso y con la particularidad, de que no se inicia dicha degeneración en la cara externa de los vasos del espacio de Kiernan, como en el caso anterior. En la fig. 22 se aprecia perfectamente la integridad de las túnicas de los vasos mencionados.

IV. DISCUSIÓN

Continuando con las ideas que han servido de base al planteamiento experimental del problema y al considerar los resultados obtenidos, debe hacerse énfasis en la existencia de contradicciones en cuanto a los efectos histopatológicos en las aflatoxicosis (7, 8, 9, 10) y, en ocasiones, podría deberse a una técnica de inoculación diferente o empleo de lotes de animales con diferencias genéticas o de crianza.

De los resultados obtenidos por nosotros parece inferirse que existen una bifurcación del proceso de acuerdo con la vía de inoculación de aflatoxina B₁. En realidad, parece como si la aflatoxina, difícilmente soluble, a no ser en solventes polares, alcanzase niveles de concentración muy distintos en diferentes vasos sanguíneos, según la vía de inoculación.

En cambio, compuestos como la dimetilnitrosamina o el dimetilaminoazobenceno, más solubles, se difundirían precozmente a través de las redes admirables del hígado, alcanzando una concentración semejante en los distintos sistemas de circulación hepática.

Parece también indudable que las dosis próximas a la letal no producen algunas de las alteraciones tóxicas de carácter agudo que se citan habitualmente: proliferación de conductillos biliares, necrosis periportal o centrolobulillar, aumento de tamaño celular, etc.

V. RESUMEN

Utilizando lotes homogéneos de distintas especies de animales de laboratorio (patipollos, rata blanca, ratón blanco y cobayo), se ha comparado la acción tóxica de la aflatoxina B₁ (DL₅₀) con la de otros compuestos carcinogenéticos (dimetilnitrosamina, dimetilaminoazobenceno), empleando las vías de inoculación digestiva e intravenosa.

De los resultados obtenidos se infiere que el proceso tóxico sigue fases diferentes de acuerdo con la vía de inoculación, lo que origina en el parénquima hepático diferente tipo de alteración hística según la DL₅₀ se inocule por vía intravenosa o digestiva.

Esta bisasicidad no ha podido demostrarse, mediante observación microscópica de preparaciones histológicas, en los otros compuestos carcinogénéticos ensayados. Parece por tanto que, una inoculación por vía diferente, en lotes distintos de animales, debidamente controlados, puede servir para incrementar la especificidad de la prueba biológica en el diagnóstico de aflatoxicosis. El cobayo parece el animal de elección a este fin, debido a la claridad con que es posible demostrar el doble tipo de alteración microscópica en el lobulillo hepático.

RESUME

En utilisant des groupes homogènes de différentes espèces d'animaux de laboratoire (canard-poussin, rat blanc, souris blanche et cobaye) on a comparé l'action毒ique de l'aflatoxine B₁(DL₅₀) avec celle d'autres composés carcinogénétiques (diméthylnitrosamine, diméthylaminoazobenzène) en employant les voies d'inoculation digestive et intraveineuse.

Des résultats obtenus on déduit que le procès toxique suit des phases différentes selon la voie d'inoculation employée, ce qui donne lieu dans le parenchyme hépatique à un type d'altération histique différent selon que la DL₅₀ soit inoculée para la voie intraveineuse ou digestive.

Cette double phase n'a pu être démontrée par l'observation microscopique de préparations histologiques, dans les autres composés carcinogénétiques. Il semble, par conséquent, qu'une inoculation par voie différente chez des animaux différents dûment contrôlés peut servir pour augmenter la spécificité de l'essai biologique pour le diagnostic d'aflatoxicose. Le cobaye semble être l'animal d'élite à cette fin, dû à la clarté avec laquelle on peut démontrer le double type d'altération microscopique dans le lobule hépatique.

SUMMARY

Using different controlled species of laboratory animals (ducklings, rats, mice and guinea pig) it has been compared the toxic action of B₁ aflatoxin (DL₅₀) with carcinogenetic compounds dimethylnitrosamine and dimethylaminoazobenzene through intravenous and digestive route.

From obtained results it is deduced the toxic process follow different phases, according with inoculation method, which produces different alteration in the hepatic tissue, with the DL₅₀ following the intravenous or digestive route.

This mentioned double phase has not been observed, by means of the microscopic examination of the hepatic tissue, in the assayed carcinogenetic compounds.

It seems possible inoculating through different route, using lots of controlled animals, to obtain better specific results in aflatoxin biological test. Guinea pig seems to be the election animal due to the very clear double reaction and microscopic alteration in hepatic lobule.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. GOLDBLATT, L. A.: *Aflatoxin*. Food Science and Technology. Series of Monographs. Academic Press, New York, 1969.
2. GOLDBLATT, L. A.: Aflatoxin and its control. *Economic Botany*. 22: 51-62, 1968.
3. GOLDBLATT, L. A.: Chemistry and control of aflatoxin. *Journ. of Chimie pure et appliquée*. 21: 331-353. 1970.
4. ARMBRECHT, B. H. y GARTH, O.: Mycotoxins. II. The biological assay of aflatoxin in Peking white Ducklings. *Toxicology and applied pharmacology*. 6: 421-426, 1964.
5. SUÁREZ FERNÁNDEZ, G.: Los animales de experimentación en la investigación de aflatoxinas. Tesina presentada en la Fac. de Ciencias de la Univ. de Oviedo, 1972.
6. SANZ SÁNCHEZ, F.: Micotoxinas y sus imbricaciones sanitarias. Comunicación presentada a la Real Academia Nacional de Medicina. *An. Real Acad. Med.* 88: 3-43, 1971.
7. SÁNCHEZ ACEDO, C. y RODRÍGUEZ MOURE, A.: Modificaciones hemáticas en pollos producidas por aflatoxinas. *An. Fac. Vet. Zaragoza* 5: 199-211, 1970.
8. SÁNCHEZ ACEDO, C., BASCUAS ASTA, S. A. y SÁNCHEZ FRANCO, A.: Estudio anatomo-patológico en las aflatoxicosis. *An. Fac. Vet. Zaragoza* 5: 181, 198, 1970.
9. SAN GABRIEL, A.: Patología de la producción de Broilers. 2. Aflatoxinas: lesiones histológicas que producen. *Rev. Patronato Biol. Animal* 4: 369-378, 1971.
10. HSI-TANG TUNG, WYATT, R. D., COOK, F. W. y HAMILTON, P. B.: Changes in the hematopoietic system during aflatoxicosis. E 159. *Abs. of Ann. Meeting of the Am. Society for Microbiol.*, 22, 1972.



Figura 1.—Hígado de pato sacrificado a las 48 horas de la inoculación por vía digestiva de una dosis única LD_{50} de aflatoxina B_1 mostrando una degeneración grasa alrededor de la vena centrolobulillar. Coloración Sudan IV ($\times 25$).



Figura 2.—Hígado de pato muerto a las 48 horas de inoculado por vía digestiva con una dosis LD_{50} de aflatoxina B_1 mostrando degeneración grasa perivenosa, en el centro del lobulillo hepático. Coloración hematoxilina-eosina ($\times 10$).



Figura 3.—Hígado de pato inoculado por vía digestiva con LD_{50} de aflatoxina B_1 sacrificado a las 48 horas, con una típica degeneración grasa centrolobulillar. Coloración hematoxilina-eosina ($\times 25$).

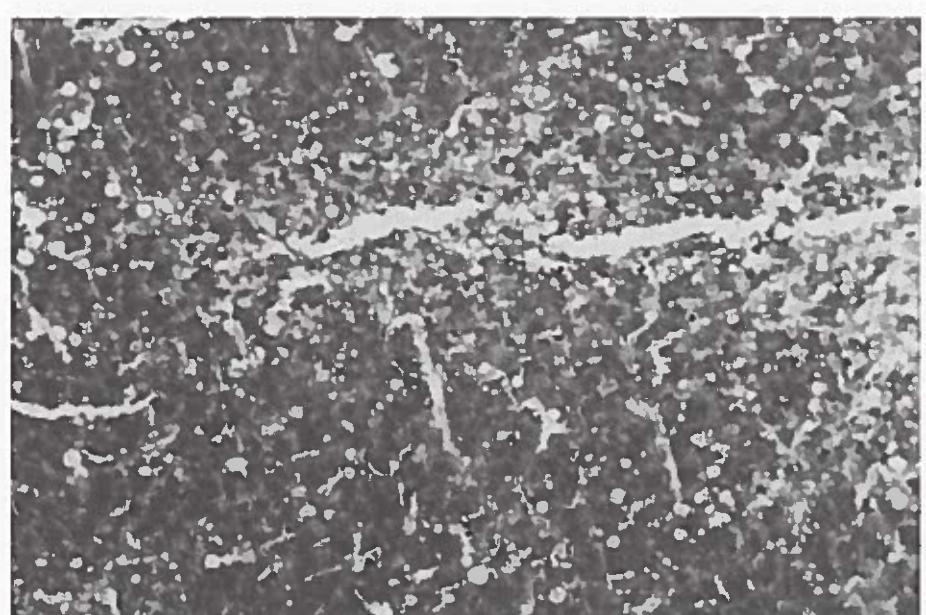


Figura 4.—Hígado de patipollo inoculado por vía intravenosa con LD_{50} de aflatoxina B_1 sacrificado a las 47 horas y con una degeneración grasa de carácter difuso en todo el parénquima hepático. Coloración hematoxilina-eosina ($\times 20$).

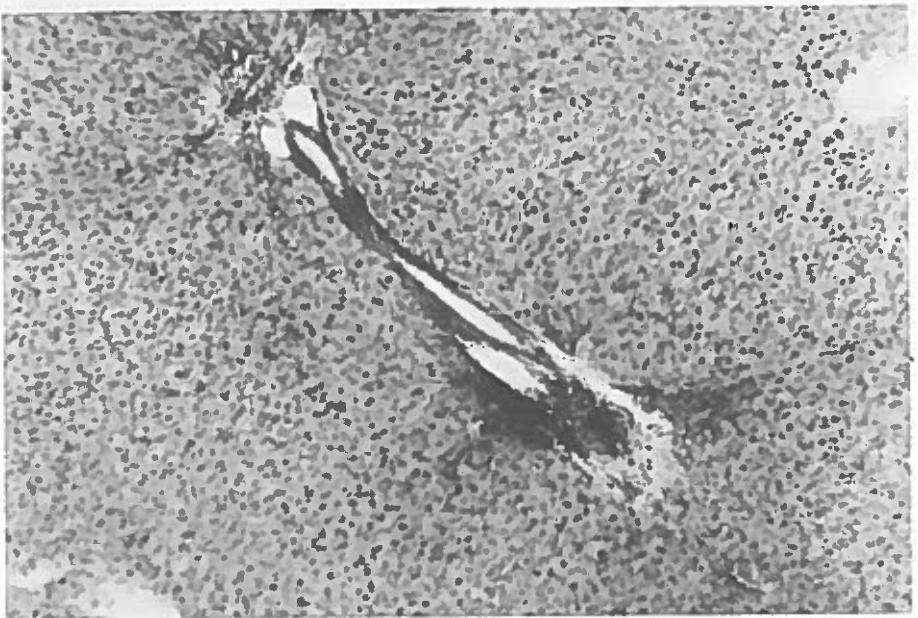


Figura 5.—Hígado de rata inoculada por vía intravenosa con LD_{50} de aflatoxina B_1 sacrificada a las 48 horas lo que produce una reacción angioblástica periportal y degeneración celular. Coloración Gallego ($\times 10$).

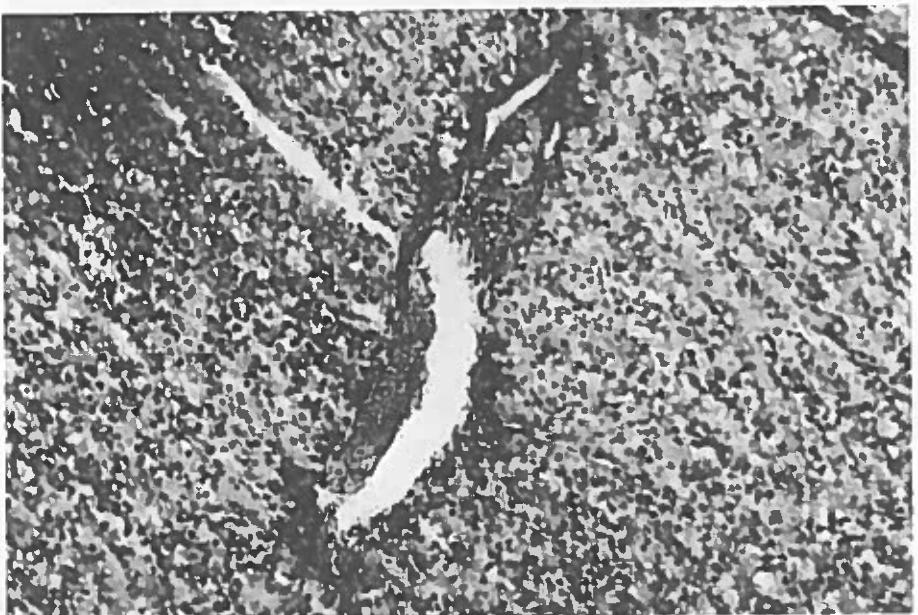


Figura 6.—Hígado de rata inoculada por vía digestiva con LD_{50} de aflatoxina B_1 sacrificada a las 48 horas y nos muestra una reacción angioblástica menos manifiesta que en la figura anterior. Coloración Gallego ($\times 10$).

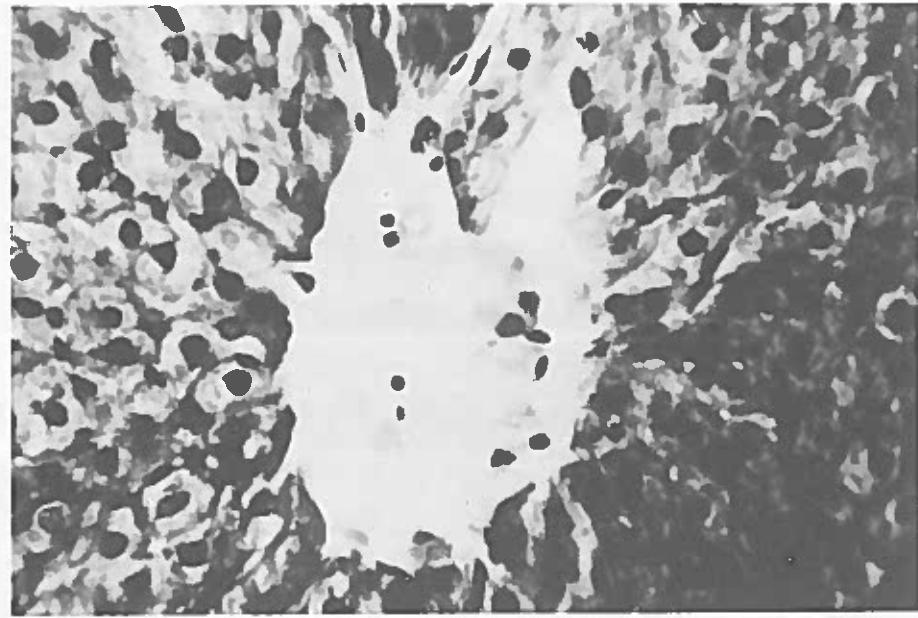


Figura 7.—Hígado de rata inoculado por vía digestiva con LD_{50} de aflatoxina B_1 sacrificada a las 48 horas y nos muestra una picnosis nuclear de células centrolobulillares. Hematoxilina-eosina ($\times 45$).

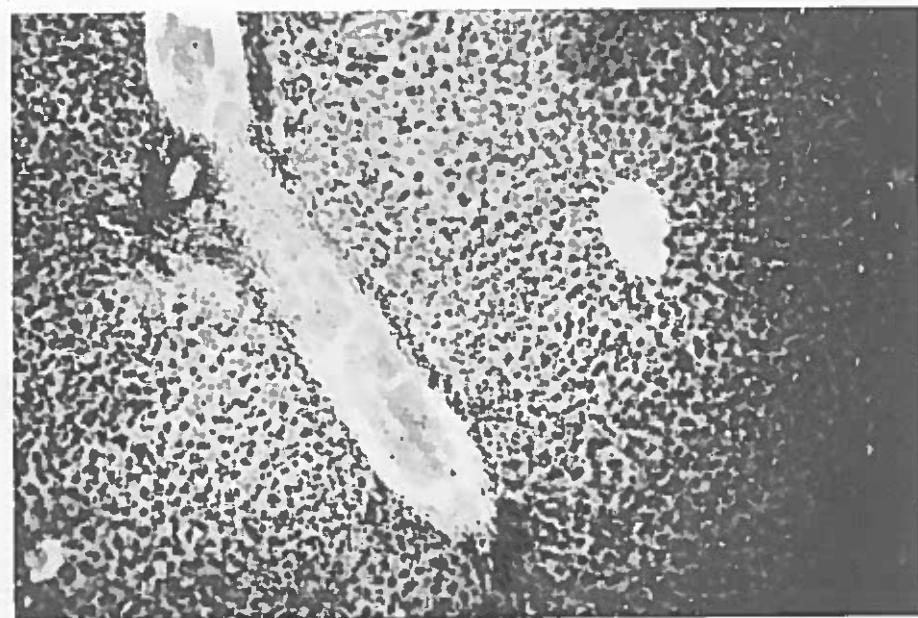


Figura 8.—Hígado de rata inoculada por vía digestiva con LD_{50} de aflatoxina B_1 muerta a las 48 horas mostrándose infiltración pericolangiolar. Hematoxilina-eosina ($\times 10$).

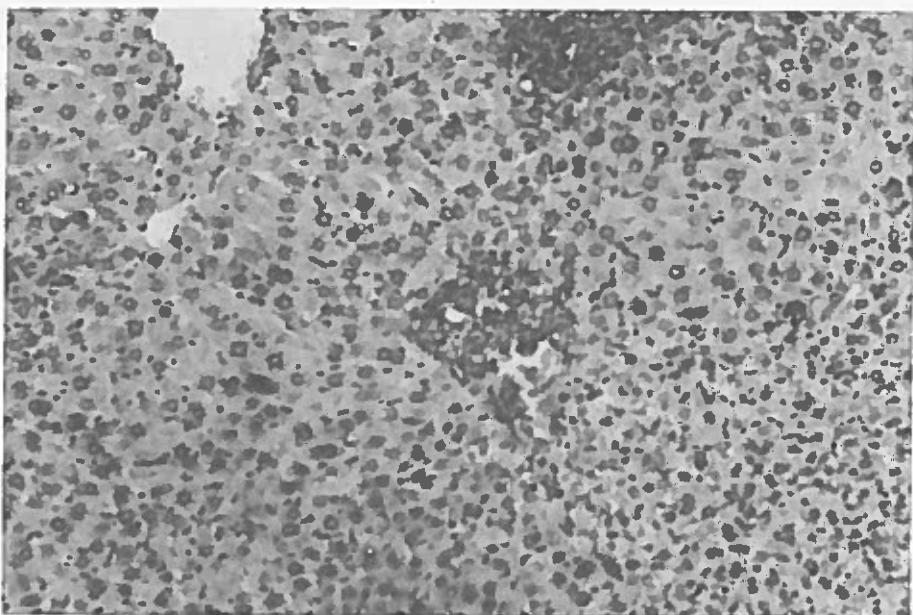


Figura 9.—Hígado de ratón inoculado por vía digestiva con LD₅₀ de aflatoxina B₁ sacrificado a las 48 horas mostrándose una abundante proliferación histiocitaria alrededor de un colangio hepático. Hematoxilina-eosina (x 10).

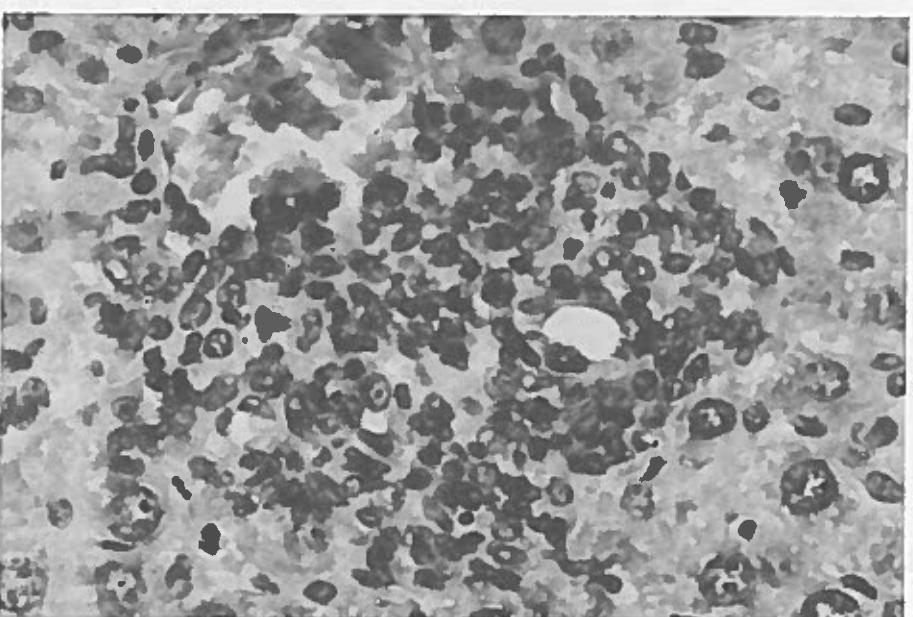


Figura 10.—Se trata de la lesión de la fig. 9 a mayor aumento (x 45).

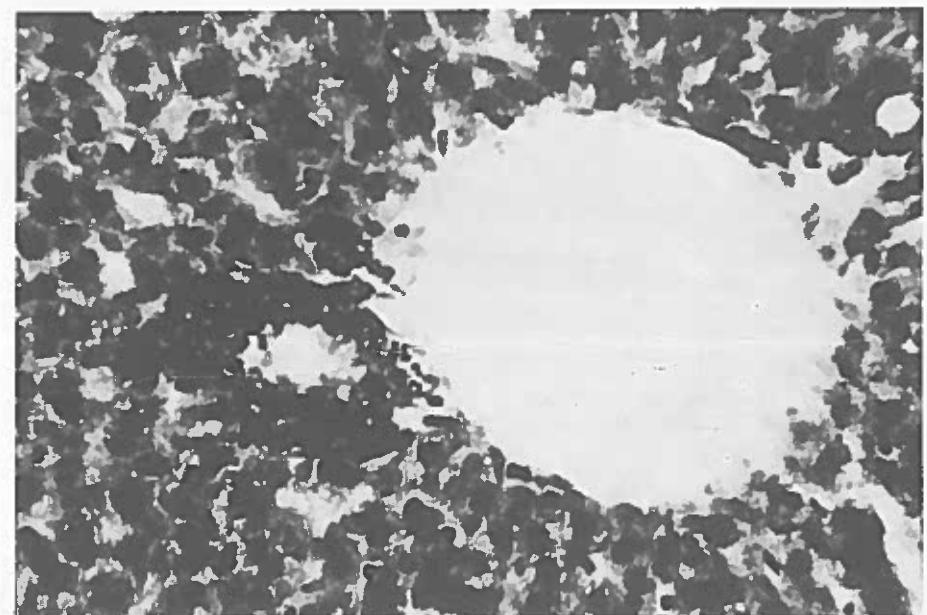


Figura 11.—Hígado de ratón inoculado por vía intravenosa con LD₅₀ de aflatoxina B₁ sacrificada a las 48 horas con reacción de infiltración pericolangiolar. Hematoxilina-eosina (x 45).

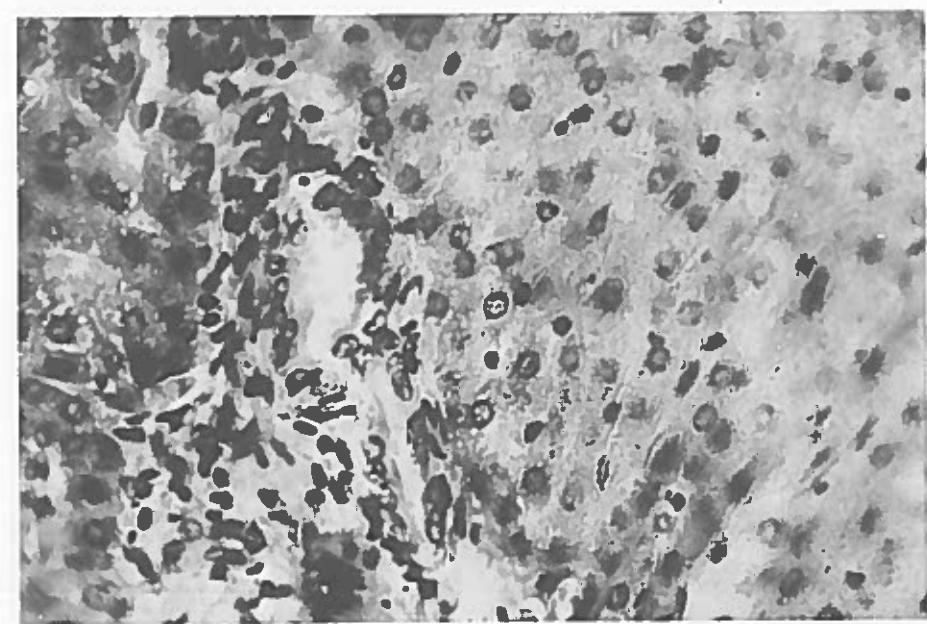


Figura 12.—Hígado de ratón inoculado por vía digestiva con LD₅₀ de aflatoxina B₁ en que se nos muestra una hipertrofia colangiolar. Hematoxilina-eosina (x 45).

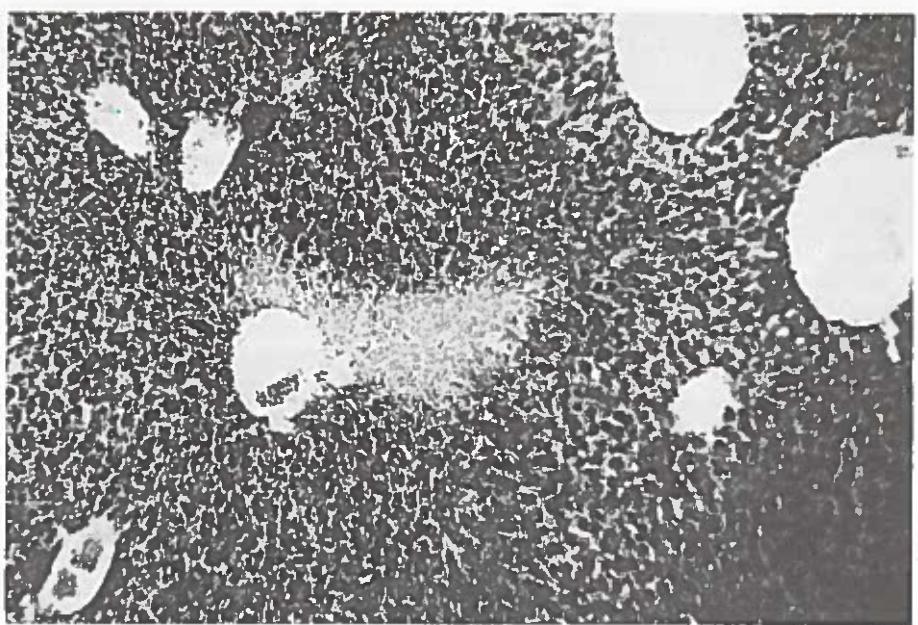


Figura 13.—Hígado de ratón inoculado con DL_{50} de aflatoxina B₁ por vía digestiva mostrándose una tumefacción turbia ($\times 45$).

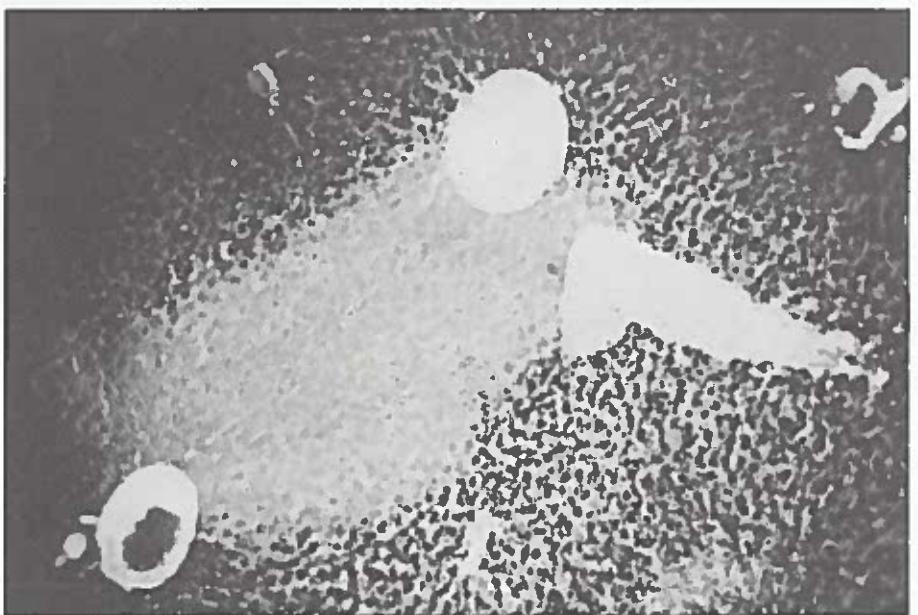


Figura 14.—Hígado de ratón inoculado con DL_{50} de aflatoxina B₁ por vía intravenosa con tumefacción turbia. Hematoxilina-eosina ($\times 45$).

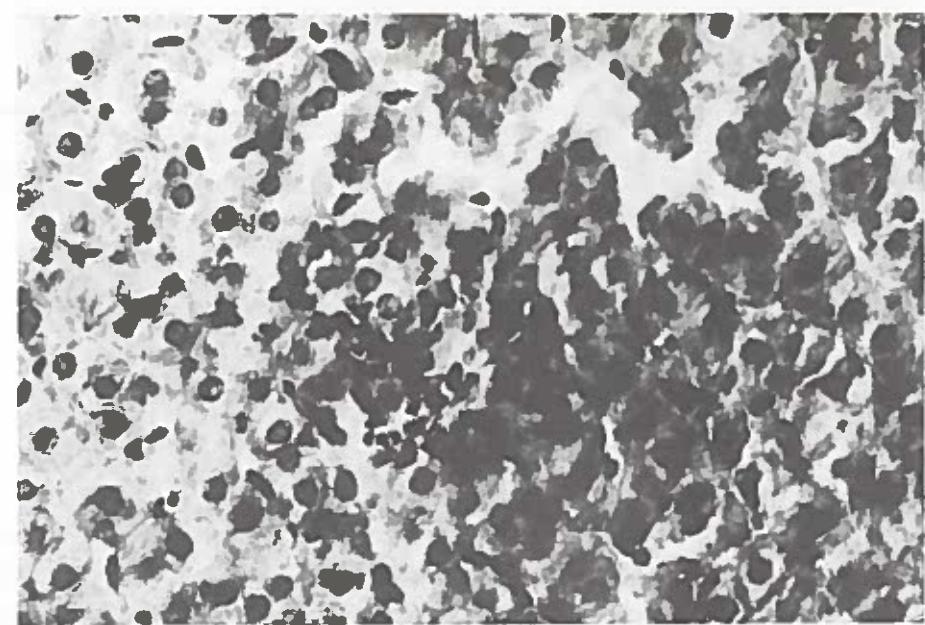


Figura 15.—Hígado de ratón inoculado con una dosis tóxica de dimetilaminoazobenceno con un proceso inflamatorio en el interior del lobulillo hepático. Hematoxilina-eosina ($\times 45$).

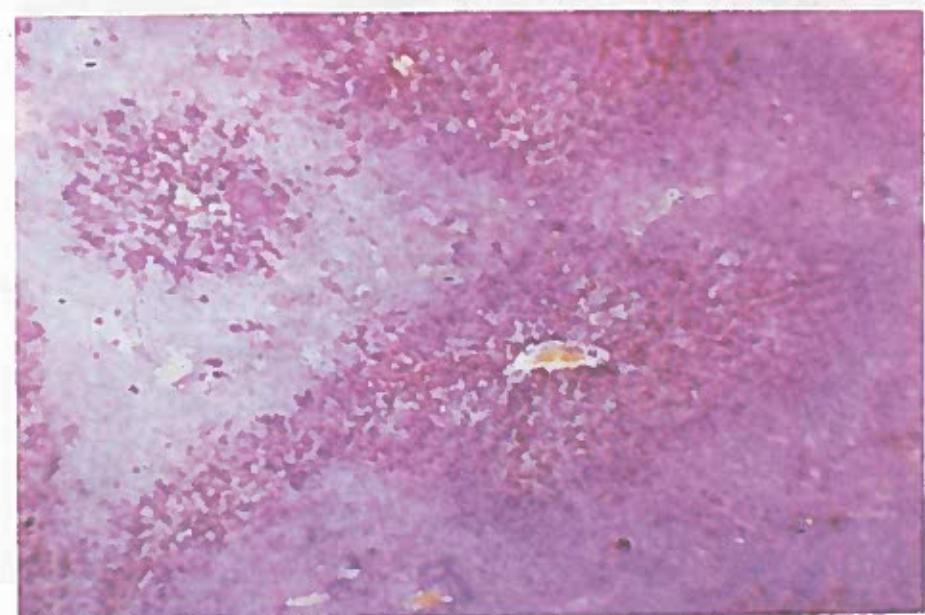


Figura 16.—Hígado de cobayo inoculado con DL_{50} de aflatoxina B₁ sacrificado a las 48 horas mostrando una degeneración grasa centrolobulillar. Coloración Sudan IV ($\times 10$).

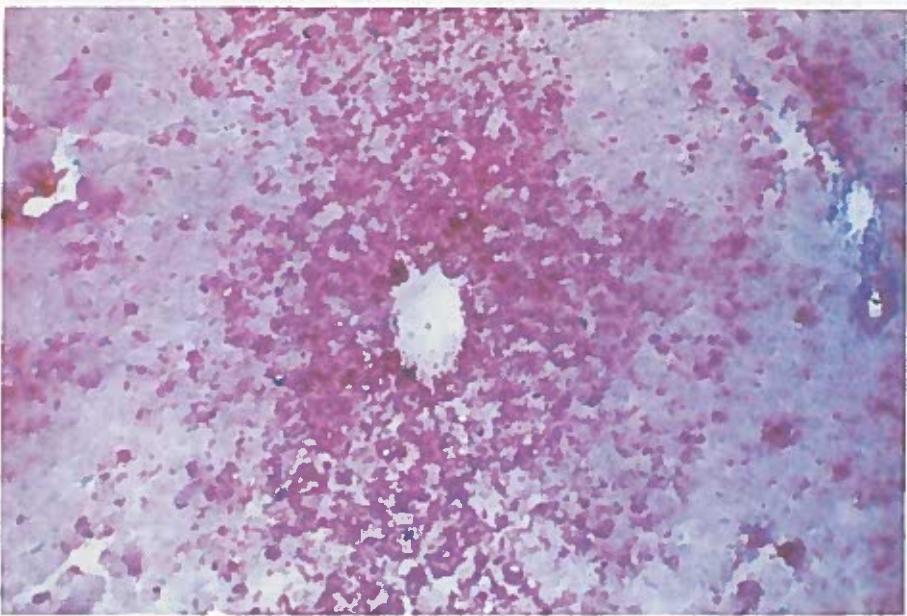


Figura 17.—Hígado de cobayo inoculado con DL_{50} de aflatoxina B₁ sacrificado a las 48 horas mostrando, como en la figura anterior, una degeneración grasa centrilobular. Coloración Sudan IV ($\times 20$).

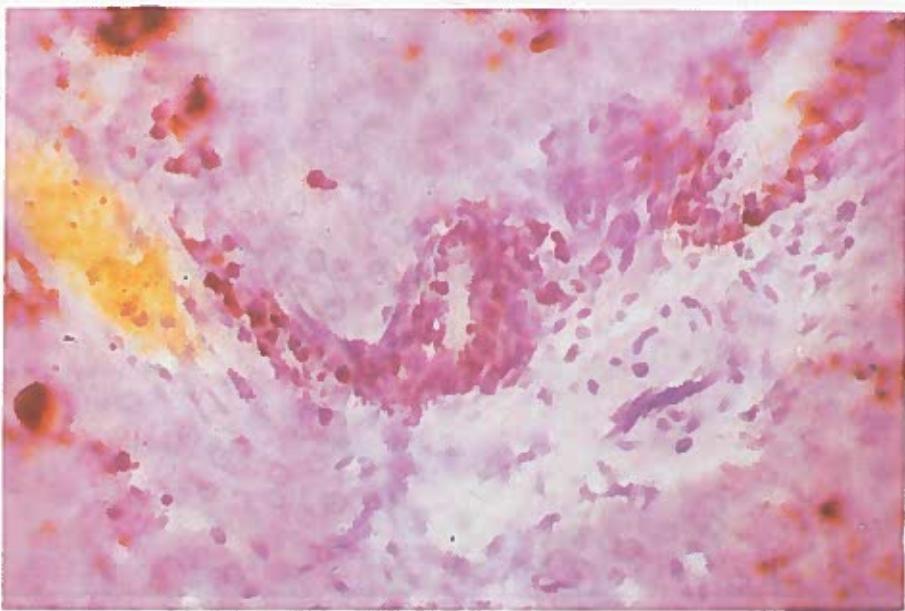


Figura 18.—Hígado de cobayo inoculado con DL_{50} de aflatoxina B₁ sacrificado a las 48 horas que nos pone de manifiesto una degeneración grasa del espacio porta. Coloración Sudan IV ($\times 45$).



Figura 19.—Hígado de cobayo inoculado con DL_{50} de aflatoxina B₁ sacrificado a las 48 horas mostrando el espacio pericentrallobular sin alteración degenerativa. Hematoxilina-eosina ($\times 10$).



Figura 20.—Hígado de cobayo inoculado con DL_{50} de aflatoxina B₁ sacrificado a las 48 horas con una infiltración de células redondas en torno a un capilar biliar. Hematoxilina-eosina ($\times 45$).

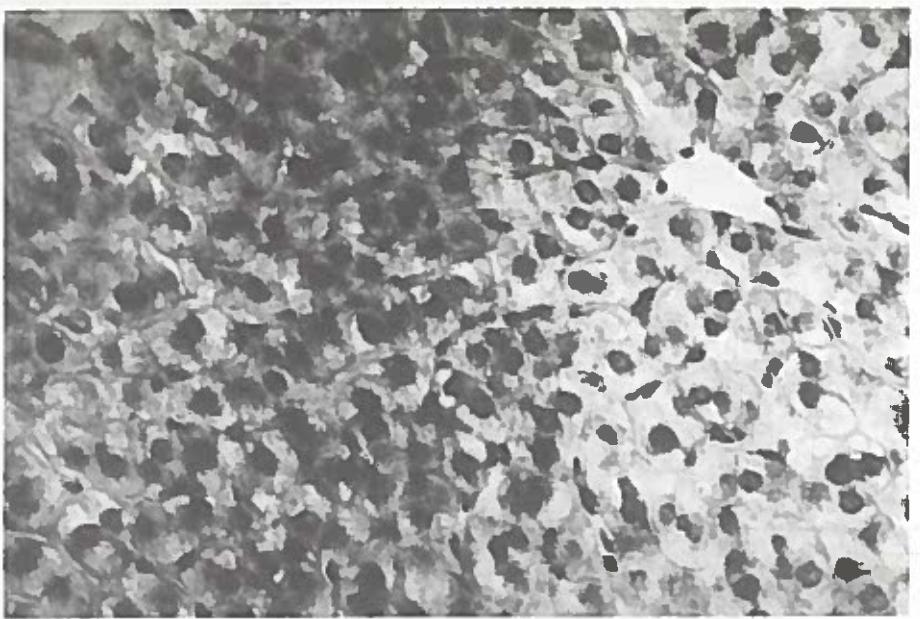


Figura 21.—Hígado de cobayo inoculado con DL_{50} de aflatoxina B_1 sacrificado a las 48 horas con hiperplasia de células de Kupffer. Hematoxilina-eosina ($\times 45$).



Figura 22.—Hígado de cobayo inoculado con DL_{50} de aflatoxina B_1 sacrificado a las 48 horas, que nos muestra de nuevo una degeneración grasa periportal. Coloración Gallego ($\times 15$).