

Metabolismo hepático de la aflatoxina B₁ en cuatro especies aviares de interés comercial

Aflatoxin B₁ hepatic metabolism in four commercial poultry species

Hansen Wilber Murcia G, PhD^{1,2} <https://orcid.org/0000-0003-0545-9307>,
Gonzalo Jair Diaz G, PhD² <https://orcid.org/0000-0002-9858-0845>

1. Grupo de Estudios en Genética y Biología Molecular GEBIMOL, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Boyacá, Colombia.
2. Grupo de Investigación en Toxicología y Nutrición Aviar. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Bogotá, Colombia.

Recibido: Agosto 25 de 2025

Aceptado: Octubre 9 de 2025

*Correspondencia del autor: Hansen Wilber Murcia G.

E-mail: hansen.murcia@uptc.edu.co

<https://doi.org/10.47499/revistaaccb.v1i37.327>

Resumen

Introducción. Los efectos adversos de la aflatoxina B₁ (AFB₁) se deben principalmente al metabolismo de esta micotoxina, el cual genera productos tóxicos como la aflatoxina B₁ epóxido o la aflatoxina B₁ dialdehído. **Objetivo.** El presente estudio busca determinar los parámetros enzimáticos de cada paso del metabolismo de la AFB₁ en el pollo, el pato, el pavo y la codorniz y comparar estos valores con los efectos observados *in vivo*. **Materiales y métodos.** Se obtuvieron por centrifugación diferencial la fracción microsomal y la fracción citosólica y con estas fracciones se realizaron incubaciones *in vitro* en las condiciones adecuadas para determinar los parámetros enzimáticos K_m, V_{max} y CL_{int} de las actividades AFB₁ epoxidasa, aflatoxicol deshidrogenasa, AFB₁ reductasa, glutatión-S-transferasa y AFB₁ aldehído reductasa. La detección tanto del sustrato como del producto de biotransformación se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia y los parámetros enzimáticos se determinaron por regresión no-lineal. **Resultados.** El pato presenta la mayor producción de AFB₁ epóxido, lo cual está asociado con su gran sensibilidad. La relación entre las actividades aflatoxicol deshidrogenasa y AFB₁ reductasa es mayor en el pato y menor en el pollo, lo cual indica que la AFB₁ presenta mayor biodisponibilidad citosólica para ser epoxidada en el pato mientras la actividad glutatión transferasa es mayor en las razas de pollo. Por último, la producción de aflatoxina B₁ mono y dialcohol es más eficiente en las razas de pollo y el pavo. **Conclusiones.** La resistencia del pollo radica en una mayor eficiencia de las reacciones de neutralización y tasas bajas de bioactivación y biodisponibilidad citosólica de la AFB₁, en contraste con el pato, especie altamente sensible o en especies de sensibilidad intermedia como el pavo y la codorniz.

Palabras clave: aflatoxicol, aflatoxina B₁-GSH, aflatoxina B₁ dihidrodiol, aflatoxina B₁-8,9-epóxido, efectos adversos, aflatoxina B₁ aldehído reductasa.

Abstract

Introduction. The adverse effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) are caused by the metabolism of this mycotoxin, where toxic products as aflatoxin B₁ epoxide and aflatoxin B₁ dialdehyde are produced. **Objective.** The present study aims to determine the enzyme kinetic parameters of each metabolic stem in the AFB₁ metabolism pathway for the chicken, duck, quail and turkey and compare these parameters with *in vivo* AFB₁ effects. **Materials and methods.** Microsomal and cytosolic fractions were obtained by differential centrifugation and assayed *in vitro*. Incubations were performed under the appropriate conditions to determine the enzymatic parameters K_m , V_{max} and CL_{int} of the activities AFB₁ epoxidase, aflatoxicol dehydrogenase, AFB₁ reductase, glutathione-S-transferase and AFB₁ aldehyde reductase. The detection of both the substrate and the biotransformation product was performed by high-performance liquid chromatography and the enzymatic parameters were determined by non-linear regression. **Results.** The duck presents the higher production of AFB₁ epoxide, which is associated with its high sensitivity. The ratio of aflatoxicol dehydrogenase to AFB₁ reductase activity is highest in ducks and lowest in chickens, indicating that AFB₁ has a greater cytosolic bioavailability for epoxidation in ducks, while glutathione transferase activity is higher in chicken breeds. Finally, the production of mono- and dialcohol aflatoxin B₁ is more efficient in chicken breeds and turkeys. **Conclusions.** Chicken resistance is due to greater efficiency of neutralization reactions and low rates of bioactivation and cytosolic bioavailability of AFB₁, in contrast to ducks, a highly sensitive species, or to species with intermediate sensitivity, such as turkeys and quails.

Keywords: aflatoxicol, aflatoxin B₁-GSH, aflatoxin B₁ dihydrodiol, aflatoxin B₁-8,9-epoxide, adverse effects, aflatoxin B₁ reductase, aflatoxin B₁ aldehyde reductase.

Introducción.

Los efectos adversos generados por la aflatoxina B₁ (AFB₁) han sido relacionados con el metabolismo de esta micotoxina, los cuales varían entre especies animales y determina su sensibilidad [1]. La susceptibilidad a las aflatoxinas, especialmente a la AFB₁ es variable entre especies, con valores de dosis letal 50 (DL₅₀) de 0.3 – 0.6 mg/kg de peso corporal para el pato (especie con sensibilidad alta), 1.4 - 3.2 mg/kg de peso corporal para el pavo (especie con sensibilidad intermedia), 6.5 - 18.0 mg/kg de peso corporal para el pollo (especie resistente) y 19.5 mg/kg de peso corporal para la codorniz (especie con sensibilidad baja);[2–4]. En la fase I del metabolismo de xenobióticos (figura 1) se ha determinado que la AFB₁ es biotransformada por enzimas citocromo P450 (CYP) presentes en el retículo endoplasmático liso (REL). Estas enzimas oxidan la AFB₁ y producen AFB₁-8,9-epóxido (AFBO); [2] lo cual es catalogado como una reacción de bioactivación. Debido a su alta reactividad el AFBO genera aductos con el DNA y por consiguiente causa los efectos genotóxicos asociados con la micotoxina [5].

Las principales CYP involucradas con la bioactivación de la AFB₁ son las CYP1A, 2A6 y 3A4 [6]. Otra ruta en

el metabolismo de la AFB₁ es su reducción a aflatoxicol (AFL) donde aparentemente la toxicidad de este metabolito radica en su conversión de nuevo a AFB₁ por una AFL deshidrogenasa [7]. Debido a la falta de evidencia respecto a la toxicidad directa por el AFL, la producción de este metabolito y la reacción reversa (oxidación del AFL) determinarían la biodisponibilidad citosólica de la AFB₁ [8]. En la fase II del metabolismo de xenobióticos se tiene a la enzima glutatión S-transferasa, que conjuga el AFBO con glutatión (GSH) y produce AFB₁-S-glutatión (AFB₁-GSH; [9], lo cual se cataloga como una reacción de inactivación.

Por otra vía dentro del metabolismo de la AFB₁, la hidrólisis espontánea del AFBO produce AFB₁ dihidrodiol (AFB₁-dhd), el cual entra en equilibrio dependiente del pH con la AFB₁ dialdehído [10]. El dialdehído puede generar aductos con la lisina de las proteínas causando citotoxicidad [11] o puede ser inactivado por la enzima aflatoxina B₁ aldehído reductasa (AFAR) a sus formas no-tóxicas conocidas como aflatoxina B₁ monoalcohol y dialcohol [12]. Para humanos, redores y otros animales se han identificado los productos de biotransformación de la AFB₁ [13,14] y las enzimas involucradas en su biotransformación [14–16].

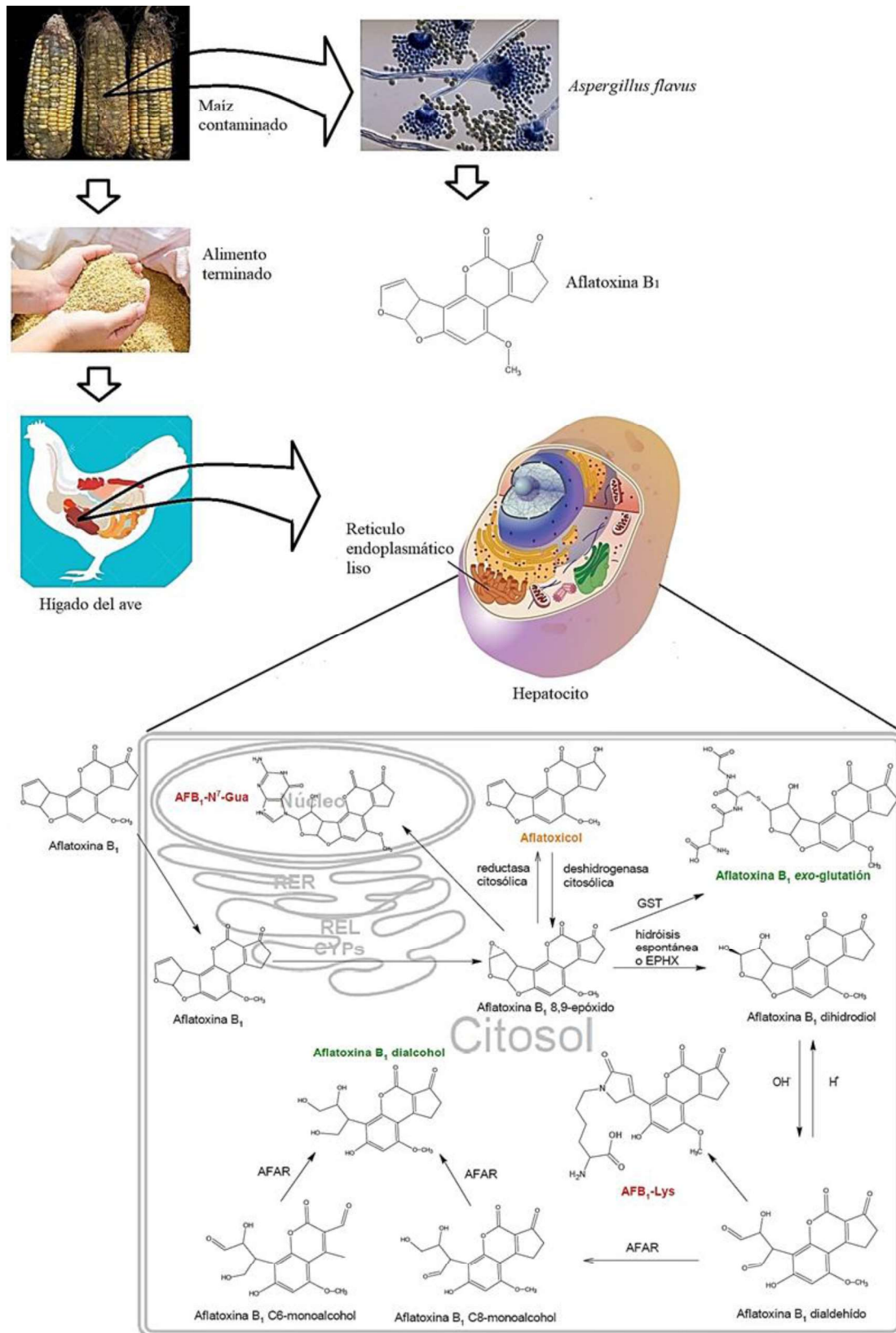


Figura 1. Metabolismo hepático de la aflatoxina B₁ (AFB₁) en aves de producción.

También se ha observado que los parámetros enzimáticos de las enzimas involucradas en el metabolismo de la AFB₁ presentan variabilidad intraespecífica e interespecífica [17]. En aves de producción como el pollo, el pavo, el pato o la codorniz se han realizado algunos ensayos donde se ha identificado la actividad AFB₁ epoxidasa a través de su metabolito hidrolizado, la AFB₁-dhd, la actividad glutatión *S*-transferasa y la actividad NADPH + H⁺ reductasa citosólica [7] pero no se reportaron parámetros enzimáticos como la constante de Michaelis-Menten (K_m), la velocidad máxima (V_{max}) o la depuración intrínseca (CL_{int}). Con el ánimo de realizar comparaciones entre especies y determinar el por qué de los efectos adversos de la AFB₁ en especies sensibles como el pato, única especie aviar que desarrolla hepatocarcinoma por el consumo de AFB₁ [18]. De acuerdo con lo anterior, el presente estudio busca determinar los valores de los parámetros K_m , V_{max} y CL_{int} y contrastar estos valores con la sensibilidad frente a la AFB₁ en el pollo, el pato, el pavo y la codorniz.

Materiales y métodos - reactivos. Los reactivos AFB_{2a}, glucosa 6-fosfato sal sódica, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), solución de ácido bicinconínico (carbonato de sodio, tartrato de sodio, bicarbonato de sodio e hidróxido de sodio 0.1 N, pH 11.25), sulfato de cobre pentahidratado, ácido fórmico, dimetilsulfóxido (DMSO), sacarosa, glicerol, albúmina sérica bovina, borohidruro de sodio, ácido *m*-cloroperbenzoico, etanol (grado espectrofotométrico), alcohol isopropílico, ácido 2-(ciclohexilamino) etanosulfónico (CHES), N,N-dimetilformamida y L-glutatión reducido se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). La aflatoxina B₁ y el aflatoxicol se obtuvieron de Fermentek Ltd. (Jerusalén, Israel). El cloruro de sodio y el cloruro de magnesio pentahidratado se adquirieron de Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, EE. UU.). El fosfato de sodio monobásico monohidratado, el fosfato de sodio dibásico anhidro, el metanol (grado HPLC) el acetonitrilo (grado HPLC) fueron de Merck (Darmstadt, Alemania). El agua grado HPLC se obtuvo en un Sistema de Purificación de agua MicroPure Barnstead Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

Obtención de hígados. Las fracciones microsomal y citosólica se obtuvieron de 12 aves (6 machos y 6 hembras) de pollos (*Gallus gallus ssp. domesticus*) raza Ross y Rhode Island Red (RIR) de siete semanas, pavos (*Meleagris gallopavo*) raza Nicholas de ocho semanas,

codornices japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) de ocho semanas y patos (*Anas platyrhynchos ssp. domesticus*) raza Pekín de nueve semanas. Los animales se obtuvieron de productores comerciales locales y se mantuvieron en un galpón por separado, en condiciones controladas de temperatura y humedad, con consumo libre de agua y alimento, el cual se probó como negativo para aflatoxinas. Para la obtención de los hígados, las aves se sacrificaron y sus hígados fueron extraídos inmediatamente, se lavaron con buffer fosfato salino frío (PBS - fosfatos 20 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM) y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

Obtención de fracción microsomal y citosólica. En el momento del procesamiento se dejó descongelar cada muestra de hígado y se homogenizaron 2.5 g de la muestra con 10 mL de buffer de extracción frío (fosfatos 50 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM y sacarosa 250 mM) durante 1 minuto utilizando un homogeneizador de tejidos (Cat X120, Cat Scientific Inc., Paso Robles, CA). El homogeneizado se centrifugó a 12000 × *g* durante 30 minutos a 4°C (IEC CL31R Multispeed Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA). El sobrenadante (fracción S12 - aproximadamente 10 mL) se colectó y se transfirió a tubos de ultracentrífuga mantenidos a 4°C, para luego centrifugar durante 90 minutos a 100000 × *g* (Sorval WX Ultra 100 Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA). El pellet resultante (fracción microsomal) se resuspendió en 3 mL de buffer de almacenamiento (fosfatos 20 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM y glicerol al 20%) y se distribuyó en tubos de microcentrífuga. El sobrenadante (fracción citosólica) también se fraccionó en tubos de microcentrífuga. Las alícuotas se almacenaron a -70°C hasta su uso. Una alícuota se utilizó para determinar el contenido proteico mediante el método de cuantificación de proteínas con ácido bicinconínico según Redinbaugh y Turley [19].

Sistema HPLC y detección por espectrometría de masas. Para la detección y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se utilizó un sistema Shimadzu Prominence (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD) equipado con una unidad de desgasificación DGU-20A3R, dos bombas LC-20AD, un muestreador automático SIL-20ACHT, un horno de columna CTO-20A, un detector de fluorescencia RF-20AXS y un módulo de bus CBM-20A, todos controlados por el software "LC Solutions". La cromatografía se realizó en una columna cromatográfica Alltech Alltima HP C18 de 150 mm x 3.0 mm (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL), mantenida a 40°C. La masa

protonada monoisotópica de los analitos se determinó con un espectrómetro de masas QTrap 3200 (Applied Biosystems, Toronto, Canadá), utilizando una sonda de ionización por termopulverización en modo positivo y los siguientes ajustes: voltaje de la sonda: 4800 V, potencial de desagrupamiento: 140 V, potencial de entrada: 10 V, valor de gas cortina: 30, energía de colisión: 81 V y potencial de salida de la celda de colisión: 5 V.

Síntesis del estándar de AFB₁-GSH y AFB₁-dhd. La producción del estándar AFB₁-GSH se realizó *in vitro* en viales de 2 mL mantenidos a 39 °C, cada uno con sistema generador de NADPH, 1.2 mg de proteína microsomal de RIR, 4,8 mg de proteína citosólica de ratón y 4 µL de AFB₁ 256 mM en DMSO. El volumen se completó a 1 mL con buffer de incubación y la reacción se detuvo después de 40 minutos con 1 mL de acetonitrilo frío. El producto de incubación se secó al vacío hasta 1 mL de volumen y se centrifugó a 15000 x g por 10 minutos. La purificación del conjugado se realizó en un sistema LC InfinityLab de Agilent Technologies (sede central de Agilent, Santa Clara, CA) equipado con un detector UV/Vis de longitud de onda variable G1314B 1260 VWD VL, un compartimento de columna termostado G1316A 1260 TCC, un muestreador automático estándar G1329B 1260 ALS y una bomba cuaternaria VL G1311C 1260, todos los módulos controlados por el software “LC Openlab CDS ChemStation Edition”. La cromatografía se realizó en una columna cromatográfica preparativa Waters µBondapak C18 125 Å de 10 µm 7.8 mm x 300 mm (Waters Corporation, Milford, MA) a 50°C. La fase móvil consistió en un gradiente lineal de A (agua, ácido fórmico al 0.1%) y B (acetonitrilo, ácido fórmico al 0.1%), con las siguientes proporciones: 0 min: 22% B, 7 min: 22% B, 7.01 min: 100% B, 10 min: 100% B, 10.01 min: 22% B, 12 min: 22% B y 17 min: 18% B. Se ajustó un flujo de 2.5 mL/min y la detección se realizó por UV a 360 nm. El volumen total de síntesis se inyectó en alícuotas de 100 µL en el sistema HPLC. Se colectó las fracciones correspondientes al aducto AFB₁-GSH, se secó en un rotavapor (Hei-Vap Advantage, Heidolph Instruments GmbH & CO, Schwabach, Alemania) y se resuspendió en etanol para la cuantificación por UV. La concentración de AFB₁-GSH se estimó a partir del coeficiente de extinción de AFB₁ ($\epsilon = 21800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Para la síntesis de la AFB₁-dhd se adicionó a 2 mL de una mezcla de agua:acetonitrilo (1:1, v/v) 5 mg de AFB₁ y 5.38 mg de ácido m-cloroperbenzoico al 70%. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minu-

tos y la AFB₁-dhd sintetizada se purificó en la columna y equipo mencionado previamente bajo las siguientes condiciones cromatográficas: un gradiente lineal de A (agua, ácido fórmico al 0.1%) y B (alcohol isopropílico al 20% en acetonitrilo, ácido fórmico al 0.1%), con los siguientes tiempos: 0 min: 18% B, 10 min: 18% B, 13 min: 100% B, 15 min: 100% B, 15.01 min: 18% B, 17 min: 18% B. El flujo se ajustó a 2.5 mL/min y se realizó la detección por UV a 365 nm. Se inyectó el volumen total de síntesis en alícuotas de 50 µL y la fracción que contenía la AFB₁-dhd se colectó y se secó en rotavapor y se resuspendió en agua ultrapura.

Incubaciones. Se realizaron siete incubaciones *in vitro* por duplicado, por individuo y por especie. Las incubaciones se realizaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL preincubados a 39°C por tres minutos, conteniendo buffer de incubación (fosfatos 50 mM, pH 7.4, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0.5 mM), fracción citosólica o microsomal según el caso, a un volumen total de 250 µL. Para las reacciones de oxidación se utilizó un sistema generador de NADPH (5 mM de glucosa 6-fosfato, 0.5 mM de NADP⁺ y 0.5 UI de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa). El inicio de la reacción se da con la adición del sustrato según el caso. Las incubaciones se mantuvieron a 39°C por el tiempo determinado para cada reacción y se detienen con 250 µL de acetonitrilo frío, se centrifugaron a 15000 x g por 10 minutos, se realizan las diluciones respectivas y se realiza el análisis por HPLC, como se menciona a continuación.

Producción enzimática de AFBO (actividad AFB₁ epoxidasa). La estimación en la producción de AFBO se realizó de manera indirecta, determinando la cantidad de AFB₁-dhd producido, debido tiempo de vida media del AFBO ($t_{1/2} = 0.5 \text{ s}$). Para las condiciones de incubación para determinar la cinética enzimática de la epoxidación de la AFB₁ ($\text{NAD(P)H} + \text{H}^+ + \text{O}_2 + \text{AFB}_1 \rightarrow \text{NAD(P)}^+ + \text{AFBO} + \text{H}_2\text{O}$) se adicionaron 1 µL de AFB₁ en DMSO a concentraciones entre 1.23 - 256 µM y 5 µg de proteína microsomal, además del sistema generador de NADPH. Se analizaron 2 µL de una dilución de 1:10 por HPLC con una fase móvil en un gradiente lineal de disolvente A (agua – ácido fórmico al 0.1%) y B (acetonitrilo:metanol, 1:1 – 0.1%), con los siguientes valores: 0 min: 25% B, 1 min: 25% B, 10 min: 60% B, 10.01 min: 25% B y 17 min: 25% B. El flujo se ajustó a 0.4 mL/min y la detección se realizó por fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 365 nm y 425 nm, respectivamente. La concentración en el vial de AFB₁-dhd se cuantificó utilizando un estándar

externo de AFB_{2a}, ya que ambos compuestos comparten propiedades espectrales idénticas.

Producción enzimática de AFL (actividad AFB₁ reductasa) y AFB₁ (actividad AFL deshidrogenasa).

Para la actividad de la enzima AFB₁ reductasa (AFB₁ + NADPH + H⁺ → AFL + NADP⁺) se adicionó 1 µL de AFB₁ en DMSO en concentraciones de 1.23 - 256 µM y 100 µg de proteína citosólica para razas de pollo y la codorniz o 25 µg para el pavo y el pato. Para la actividad de la enzima AFL deshidrogenasa (AFL + NAD(P)⁺ → AFB₁ + NAD(P)H + H⁺) la incubación contenía 1 µL de AFL en DMSO en concentraciones de 5.2 - 254.7 µM, NADP⁺ 0.5 mM y 10 µg de proteína citosólica, excepto en el caso del pavo donde se utilizaron 5 µg. Se analizaron por HPLC 2 µL de una dilución 1:10 en fase móvil (excepto en el caso del pavo y el pato, donde se realizó una dilución 1:100). La fase móvil consistió en un gradiente lineal de disolvente A (agua - ácido fórmico al 0.1%) y B (acetonitrilo - metanol 1:1 - ácido fórmico al 0.1%), con las siguientes proporciones: 0 min: 25% B, 1 min: 25% B, 10 min: 60% B, 10.01 min: 25% B y 17 min: 25% B. Se ajustó un flujo de 0.4 mL/min y la detección se realizó por fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 365 nm y 425 nm, respectivamente.

Producción enzimática de AFB₁-GSH (actividad glutatión S-transferasa).

Para la reacción AFBO + GSH → AFB₁-GSH se utilizó un sistema generador de NADPH y se adicionó 100 mg de proteína microsomal de pollo raza Rhode Island Red (sistema generador de AFBO), 1 µL de AFB₁ en DMSO a concentraciones de 8.6 - 157.5 mM para las razas de pollo, de 5.3 - 96.9 mM para la codorniz y el pavo, de 2.0 - 36.7 mM para el pato y 800 mg de proteína citosólica para razas de pollo, 1600 mg para la codorniz, 4800 mg para el pavo y el pato. Se analizaron 2 µL y la cantidad tanto de sustrato (AFB₁) como de producto (AFB₁-GSH) se cuantificó por HPLC en un gradiente lineal con una fase móvil que consiste de agua - ácido fórmico al 0.1 % (A) y acetonitrilo: metanol 1:1 - ácido fórmico al 0.1% (B), con las siguientes proporciones: 0 min: 17% B, 1 min: 17% B, 10 min: 20% B, 10.01 min: 100% B, 12 min: 100%, 12.01 min: 17% y 18 min: 17% B. El flujo se ajustó a 0.6 mL/min y la detección se realizó por fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 360 y 440 nm, respectivamente. La concentración de AFB₁-GSH en el vial se cuantificó utilizando un estándar de AFB₁-GSH sintetizado enzimáticamente con fracción citosólica de ratón.

Producción enzimática de AFB₁ monoalcohol y dialcohol (actividad AFB₁ aldehído reductasa). Para determinar la cinética enzimática de la reducción de la AFB₁ dialdehído (AFB₁ dialdehído + NADPH + H⁺ → AFB₁ monoalcohol + NAD⁺) y la reducción de la AFB₁ monoalcohol (monoalcohol + NADPH + H⁺ → AFB₁ dialcohol + NAD⁺) por la enzima AFB₁, se obtuvo la AFB₁ dialdehído ajustando a pH 10 (con buffer CHES 25 mM) la AFB₁-dhd obtenida por reducción química del AFB₁-dhd con borohidruro de sodio. Se utilizaron 30 µg de proteína citosólica para razas de pollo y el pavo, 50 µg para el pato y 70 µg para la codorniz más el sistema generador de NADPH. La reacción se inició con 4 µL de AFB₁-dhd en buffer CHES 25 mM pH 10 en concentraciones de 3.38 - 66.4 µM y la reacción se detuvo después de 90 segundos. La cantidad de AFB₁ monoalcohol y de AFB₁ dialcohol producido se cuantificó analizando por HPLC 5 µL de incubación, utilizando una fase móvil en gradiente lineal de solventes A (agua - 0.1% de ácido fórmico) y B (acetonitrilo - 0.1% ácido fórmico) de la siguiente forma: 0 min: 5% B, 1 min: 5% B, 15 min: 15% B, 15.01 min: 5% B, 20 min: 5% B, a un flujo de 0.6 mL/min y con detección por fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 360 nm y 440 nm, respectivamente. La concentración de AFB₁ monoalcohol y AFB₁ dialcohol se determinó utilizando estándares de AFB₁ monoalcohol y AFB₁ dialcohol sintetizados químicamente.

Aspectos éticos. El presente proyecto tuvo aval por parte del comité de bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, documento de aprobación CB-FMVZ-UN-033-18. Se utilizaron los métodos para el sacrificio de aves según la “Humane Slaughter Association” [20] y la “AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals” [21].

Análisis estadístico. Los parámetros enzimáticos K_m y V_{max} se determinaron mediante regresión no-lineal mediante el método de Marquardt, ajustando los datos a la cinética enzimática de Michaelis-Menten según la ecuación: $v = V_{max} [S] / K_m + [S]$, donde v es la velocidad de reacción enzimática, [S] representa la concentración de sustrato, V_{max} representa la velocidad máxima y K_m representa la constante de Michaelis-Menten. La depuración intrínseca (CL_{int}; mL/mg de proteína/minuto) se calculó como el cociente V_{max}/K_m. Las diferencias inter-especies en los parámetros cinéticos enzimáticos se determinaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, mientras que las comparaciones múltiples no paramé-

tricas se realizaron mediante el método de Dwass-Stel-el-Critchlow-Fligner, con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$). Todos los análisis se realizaron con el software Statistical Analysis System (SAS versión 9.4; SAS/STAT, 2017).

Resultados - Epoxidación de la AFB₁. En la figura 2A se puede apreciar que las razas de pollo y la codorniz no alcanzan el nivel de saturación a la concentración máxima utilizada de AFB₁ (256 μ M), mientras que el pato alcanza un máximo de actividad a una concentración de 25 μ M. En figura 2B se aprecia que la raza RIR y la codorniz presentan las mayores capacidades de producción de AFBO, pero los valores del K_m demuestran que en el pato la producción de AFBO requiere de una concentración mucho menor de AFB₁ que en las demás aves (figura 2C). De hecho, la eficiencia en la biotransformación de la AFB₁ a AFBO es más de 11 veces mayor en el pato, según el valor del CL_{int} (figura 2D).

Reducción de la AFB₁ a AFL. En la figura 3A se aprecia que la saturación de la reacción de reducción de AFB₁ en el pato requiere de una gran cantidad de AFB₁, a diferencia de las demás especies aviares. Realizando la misma gráfica, pero en un rango 1.23 - 24 μ M de AFB₁ (figura 3B) se observa que las razas de pollo inician la producción de AFL a concentraciones de AFB₁ mucho menores que el pato, el pavo o la codorniz. La capacidad de producción representada en el V_{max} es mucho mayor en el pato (figura 3C) pero la concentración de AFB₁ requerida para iniciar la biotransformación a AFL es mucho menor en las razas de pollo (figura 3D). Así, la eliminación de la AFB₁ y producción de AFL es más eficiente en las razas de pollo y menos eficiente en el pato, el pavo y la codorniz (figura 3E).

Oxidación del AFL a AFB₁. La cinética de producción de AFB₁ a partir del AFL (figura 4A) muestra como las razas de pollo y la codorniz alcanzan la saturación a una concentración de 156 μ M de AFL. La capacidad de producción en pato y pavo son las más altas (figura 4B) pero aparentemente se alcanzan a concentraciones mayores de 256 μ M. Para iniciar la oxidación del AFL, las razas de pollo y la codorniz requieren de concentraciones de AFL menores que el pato y el pavo (figura

4C). Como consolidado, el CL_{int} demuestra que las razas de pollo y el pato presentan una mayor eficiencia en la conversión de AFL a AFB₁ entre las especies aviares (figura 4D).

Cociente AFL CL_{int} / AFB₁ CL_{int} . Para poder entender la relación entre la eficiencia en la producción de AFB₁ a partir de AFL y la reacción inversa, la figura 5 presenta el cociente del CL_{int} para estas dos reacciones, donde se puede valorar producción neta de AFB₁ a partir del AFL. En este gráfico se evidencia que en el pato la producción neta de AFB₁ a partir de AFL es la mayor, al menos 2.7 más que en las razas de pollo.

Producción de AFB₁-GSH. En la figura 6A se presenta la cinética de la producción de AFB₁-GSH, donde la codorniz, el pavo y el pato llegan a punto de saturación por debajo de 100 μ M de AFB₁, mientras las razas de pollo requieren de más de 160 μ M de AFB₁ para llegar al punto de saturación. Efectivamente, la figura 6B muestra que la capacidad de la actividad GST es mayor en las razas de pollo, seguido de la codorniz y por último el pato y el pavo. Además, la concentración de AFB₁ requerida para iniciar la inactivación del AFBO es la más baja en las razas de pollo, seguido del pato y por último el pavo y la codorniz (figura 6C). La eliminación del AFBO y producción del conjugado es de dos a tres veces mayor en las razas de pollo que en el pato o el pavo (figura 6D).

Producción AFB₁ monoalcohol. Para el último paso del metabolismo de la AFB₁ se encuentra que la producción de AFB₁ monoalcohol no alcanza el punto de saturación a la máxima concentración de 66.4 μ M de AFB₁ dialdehído (figura 7A). La estimación de la capacidad de producción de monoalcohol por regresión no-lineal arroja un valor más alto para la raza RIR respecto a las demás especies (figura 7B). La concentración de AFB₁ dialdehído requerida para producir el monoalcohol es más baja en la raza Ross, seguida del pavo y el pato, y por último la codorniz y la raza RIR (figura 7C). La eficiencia en la producción del monoalcohol es más alta en el pavo, seguido de las razas de pollo (figura 7D).

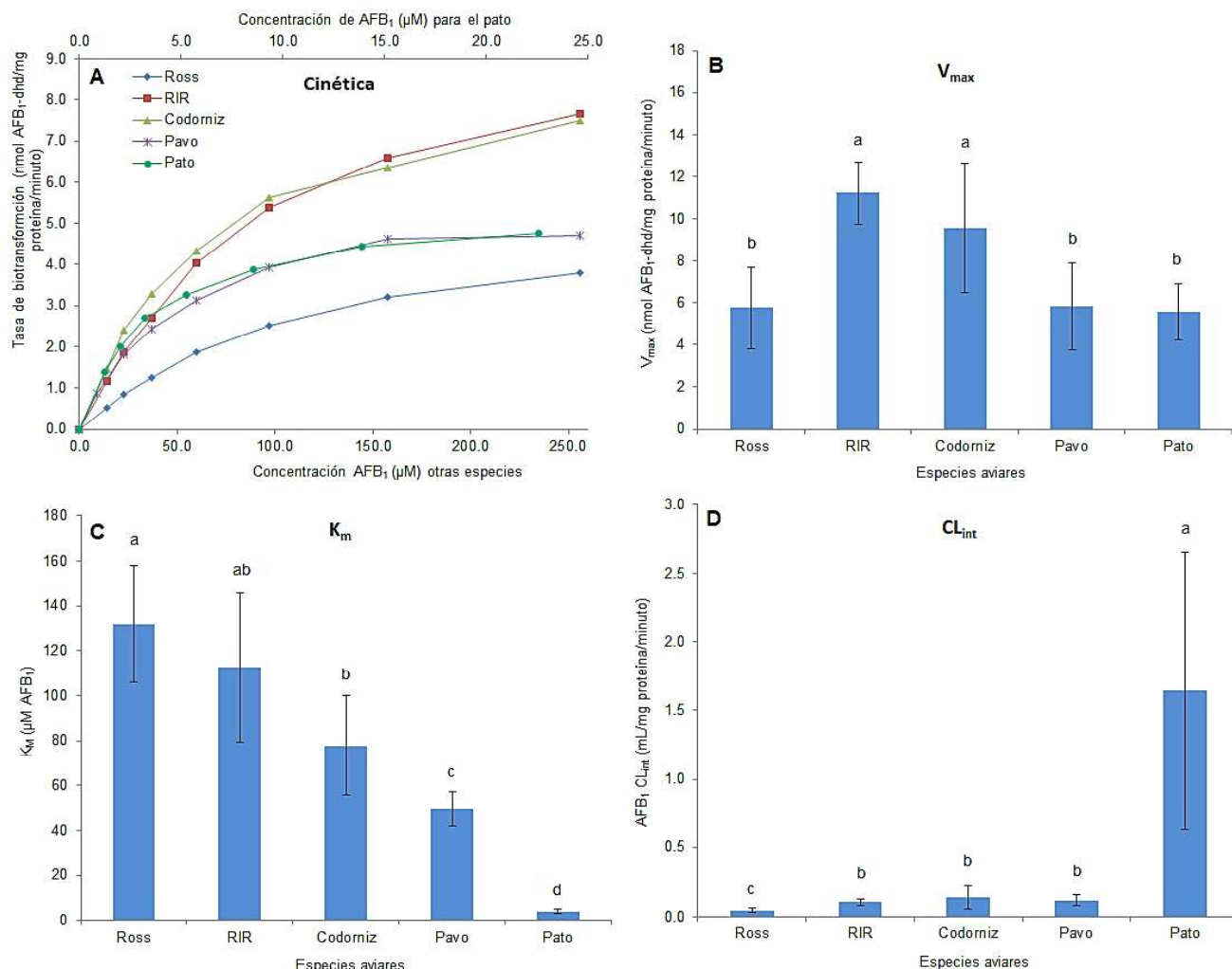


Figura 2. Producción de AFB₁-dhd en las razas de pollo, en el pavo, el pato y la codorniz. Se presenta la cinética enzimática (cinética de Michaelis-Menten) en un rango de concentración de 13.9 - 256 μM (A), el valor de la velocidad máxima (V_{max} - B), el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m - C) y el valor de la depuración intrínseca (CL_{int} - D). Los valores son estimados para 12 individuos por duplicado. Las incubaciones con la fracción microsomal de pato se realizaron a concentraciones de AFB₁ entre 1.23 - 22.6 μM. Los valores se calculan para 12 individuos por duplicado ±SD. Los valores con la misma letra no difieren significativamente. RIR: Rhode Island Red.

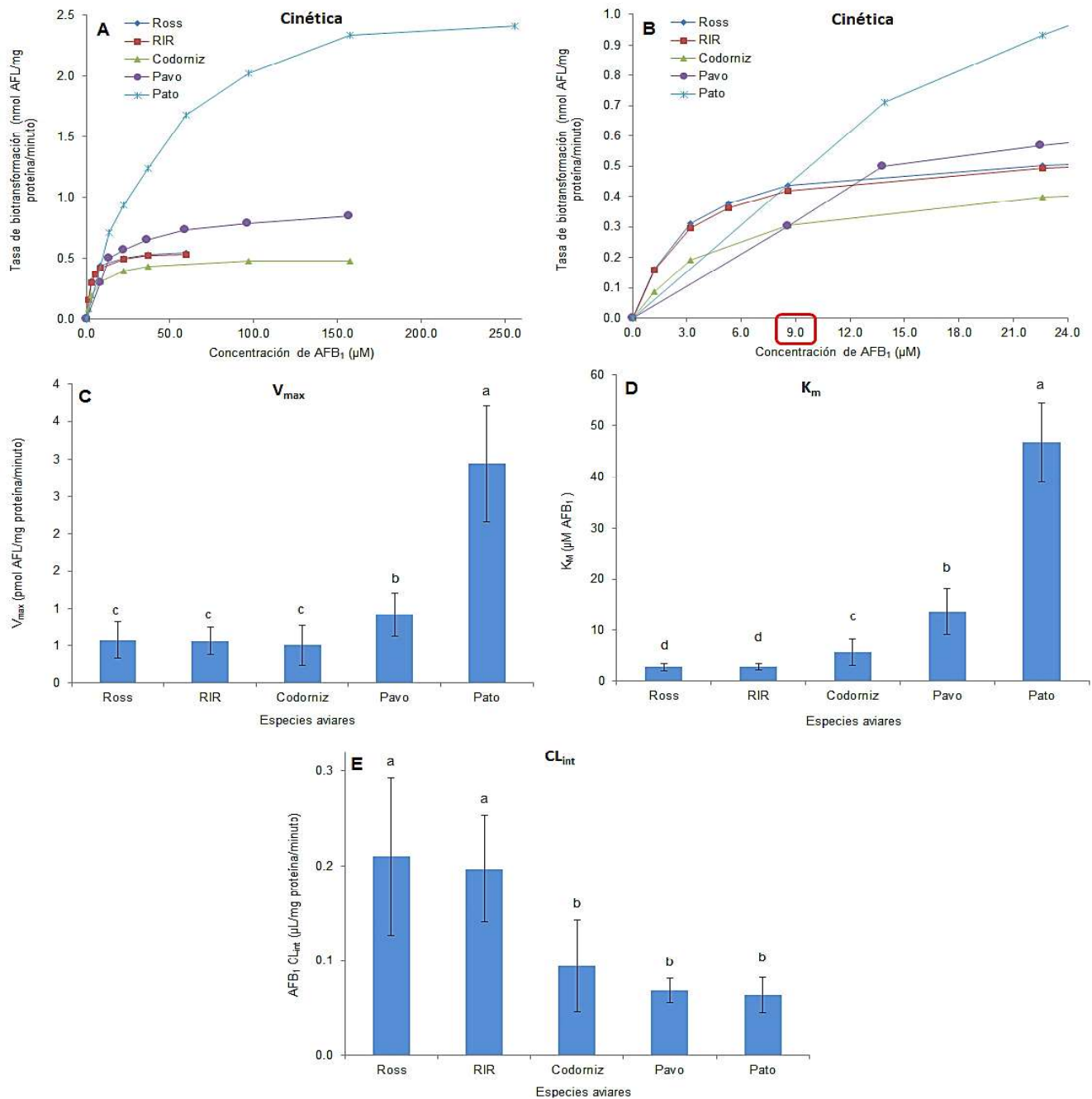


Figura 3. Producción de AFL en las razas de pollo, en el pavo, el pato y la codorniz. Se presenta la cinética enzimática (cinética de Michaelis-Menten) en un rango de concentración de 1.23 - 59.7 μM para las razas de pollo, 1.23 - 157 μM para la codorniz y el pavo y 13.9 - 256 μM para el pato (A), la cinética enzimática en un rango de concentración de 1.23 - 24 μM (B), la velocidad máxima (V_{max} - C), el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m - D) y el valor de la depuración intrínseca (CL_{int} - E). Los valores son estimados para 12 individuos por duplicado \pm SD. Los valores con la misma letra no difieren significativamente. RIR: Rhode Island Red.

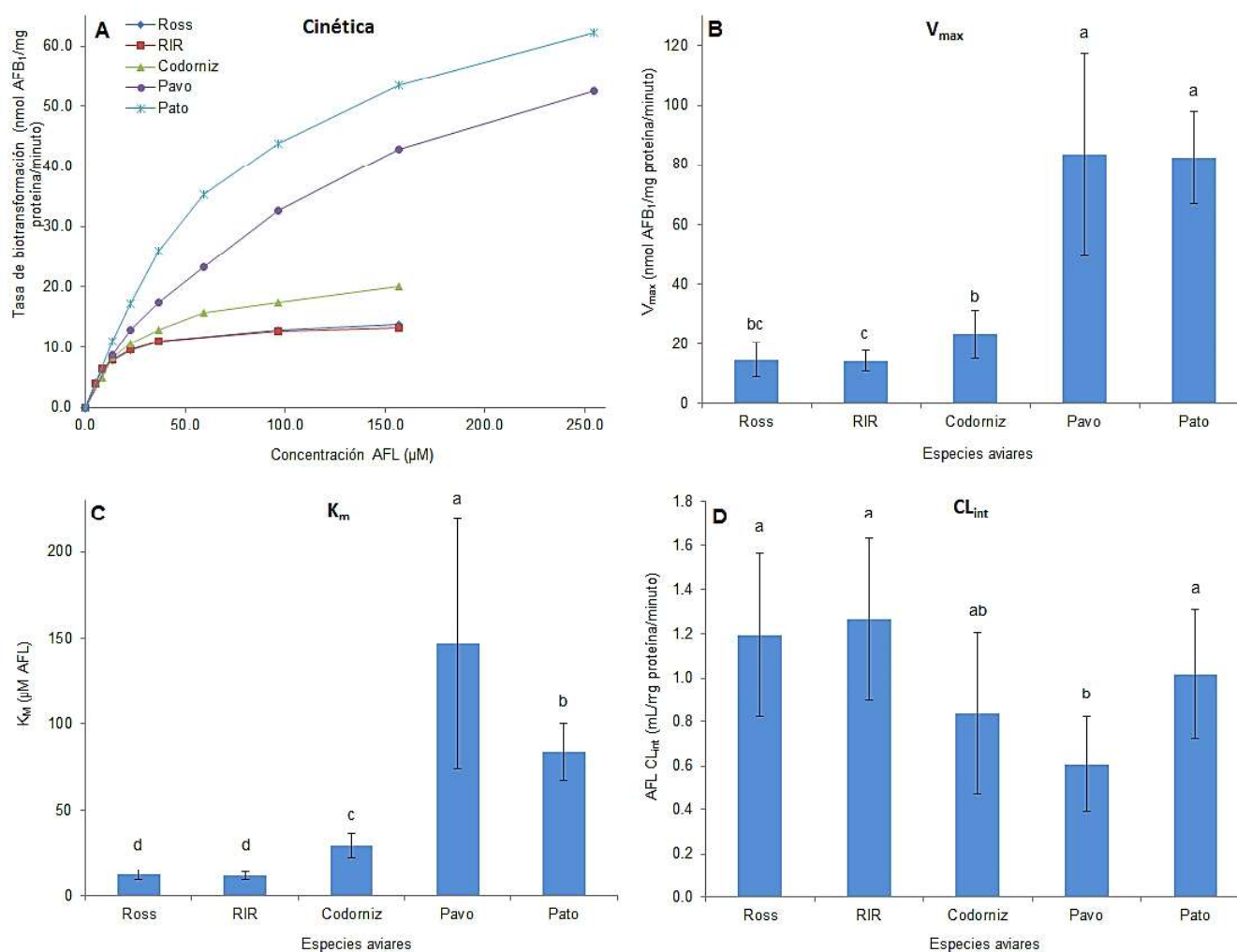


Figura 4. Producción de AFB₁ a partir de AFL en las razas de pollo, en el pavo, el pato y la codorniz. Se presenta la cinética enzimática (cinética de Michaelis-Menten) en un rango de concentración de 13.9 - 256 μM (A), la velocidad máxima (V_{max} - B), el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m - C) y el valor de la depuración intrínseca (CL_{int} - D). Los valores son estimados para 12 individuos por duplicado ± SD. Los valores con la misma letra no difieren significativamente. RIR: Rhode Island Red.

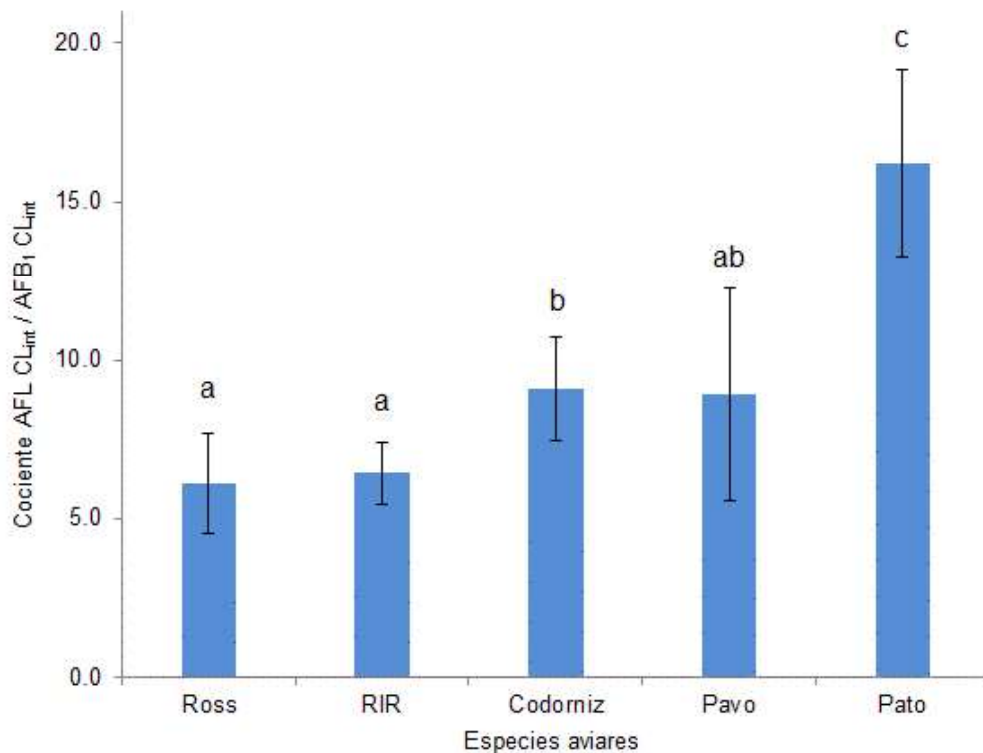


Figura 5. Relación entre la depuración intrínseca del AFL (producción AFB₁) y depuración intrínseca de la AFB₁ (producción AFL) en las razas de pollo, en el pavo, el pato y la codorniz. Los valores son estimados para 12 individuos por duplicado \pm SD. Los valores con la misma letra no difieren significativamente. RIR: Rhode Island Red.

Producción AFB₁ dialcohol. Finalmente, la cinética de producción de AFB₁ dialcohol (figura 8A) muestra que a la máxima concentración de AFB₁ dialdehído (66.4 μ M) se alcanza el punto de saturación en todas las especies aviares. Para la capacidad de biotransformación se evidencia una mayor producción del dialcohol en las razas de pollo y el pavo (figura 8B), mientras la concentración para iniciar la reducción de la AFB₁ dialdehído no presenta diferencias entre especies (figura 8C). En la figura 8D se aprecia que la eliminación del dialdehído es más eficiente en las razas de pollo y en el

pavo, según el valor del CL_{int}. La tabla 1 presenta la relación de la producción del AFB₁-dhd y la producción de AFB₁ mono y dialcohol. De la relación “producción AFB₁-dhd / producción AFB₁ dialcohol” y “producción AFB₁-dhd / producción AFB₁ monoalcohol” se puede evidenciar que en el pato la producción de AFB₁-dhd es mucho más alta que la generación de los productos de detoxificación AFB₁ mono y dialcohol. En contraste, las razas de pollo y el pavo presentan una mayor tasa de eliminación de la AFB₁-dhd. También se confirma la mayor producción de AFB₁ monoalcohol sobre el dialcohol.

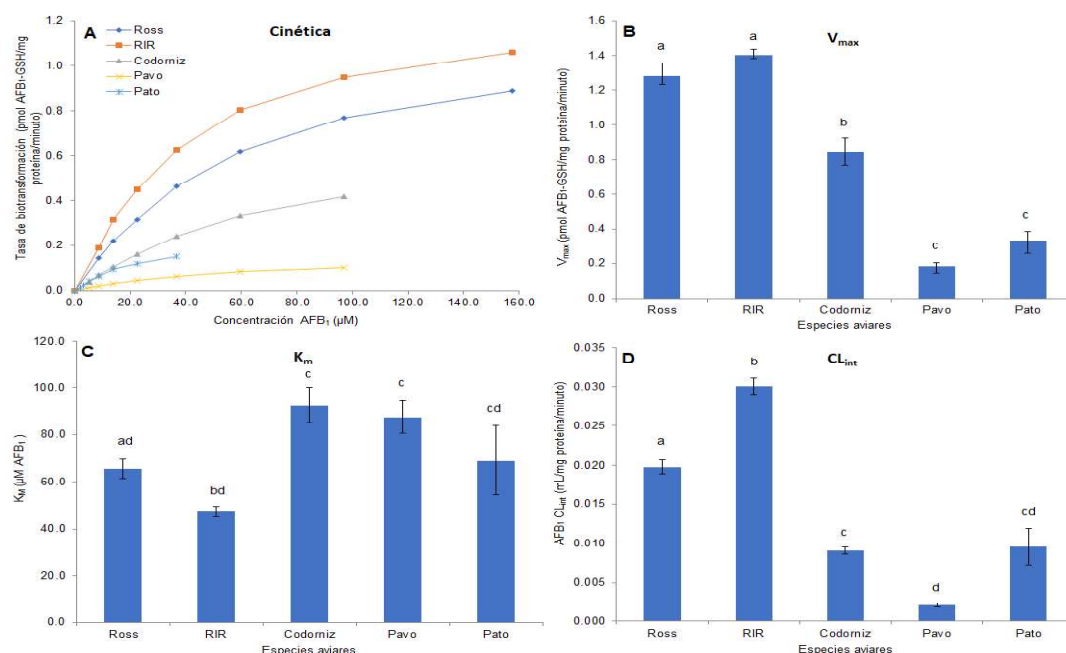


Figura 6. Producción de AFB₁-GSH en las razas de pollo, en el pavo, el pato y la codorniz. Se presenta la cinética enzimática (cinética de Michaelis-Menten) en un rango de concentración de 2.0 - 157.5 μ M (A), la velocidad máxima (V_{max} - B), el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m - C) y el valor de la depuración intrínseca (CL_{int} - D). Los valores son estimados para 12 individuos por duplicado \pm SD. Los valores con la misma letra no difieren significativamente. RIR: Rhode Island Red.

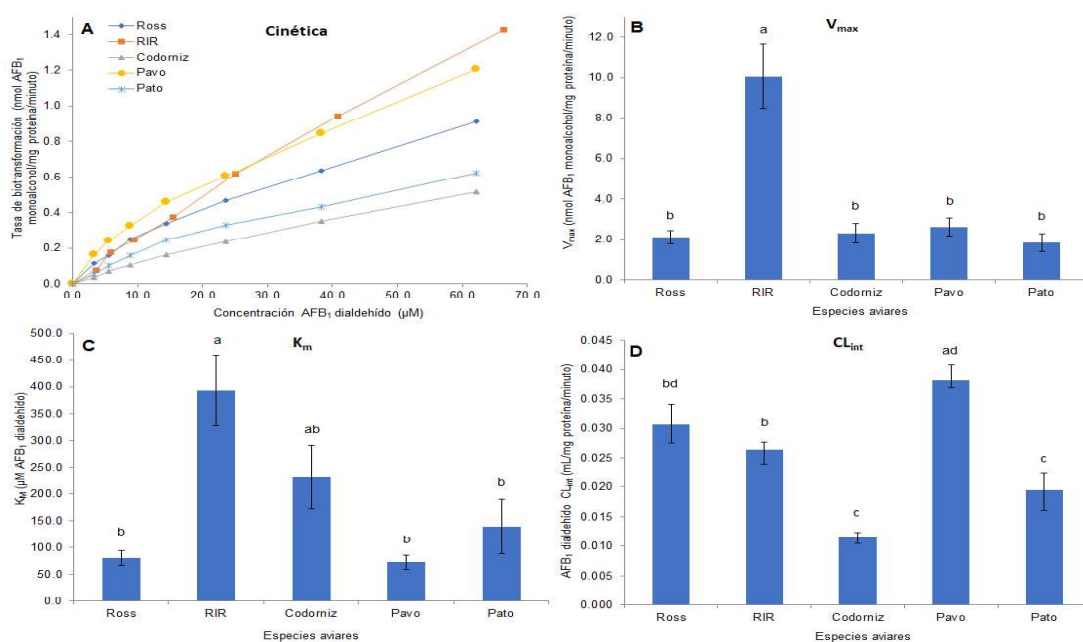


Figura 7. Producción de AFB₁ monoalcohol en las razas de pollo, en el pavo, el pato y la codorniz. Se presenta la cinética enzimática (cinética de Michaelis-Menten) en un rango de concentración de 3.4 - 66.4 μ M (A), la velocidad máxima (V_{max} - B), el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m - C) y el valor de la depuración intrínseca (CL_{int} - D). Los valores son estimados para 12 individuos por duplicado \pm SD. Los valores con la misma letra no difieren significativamente. RIR: Rhode Island Red.

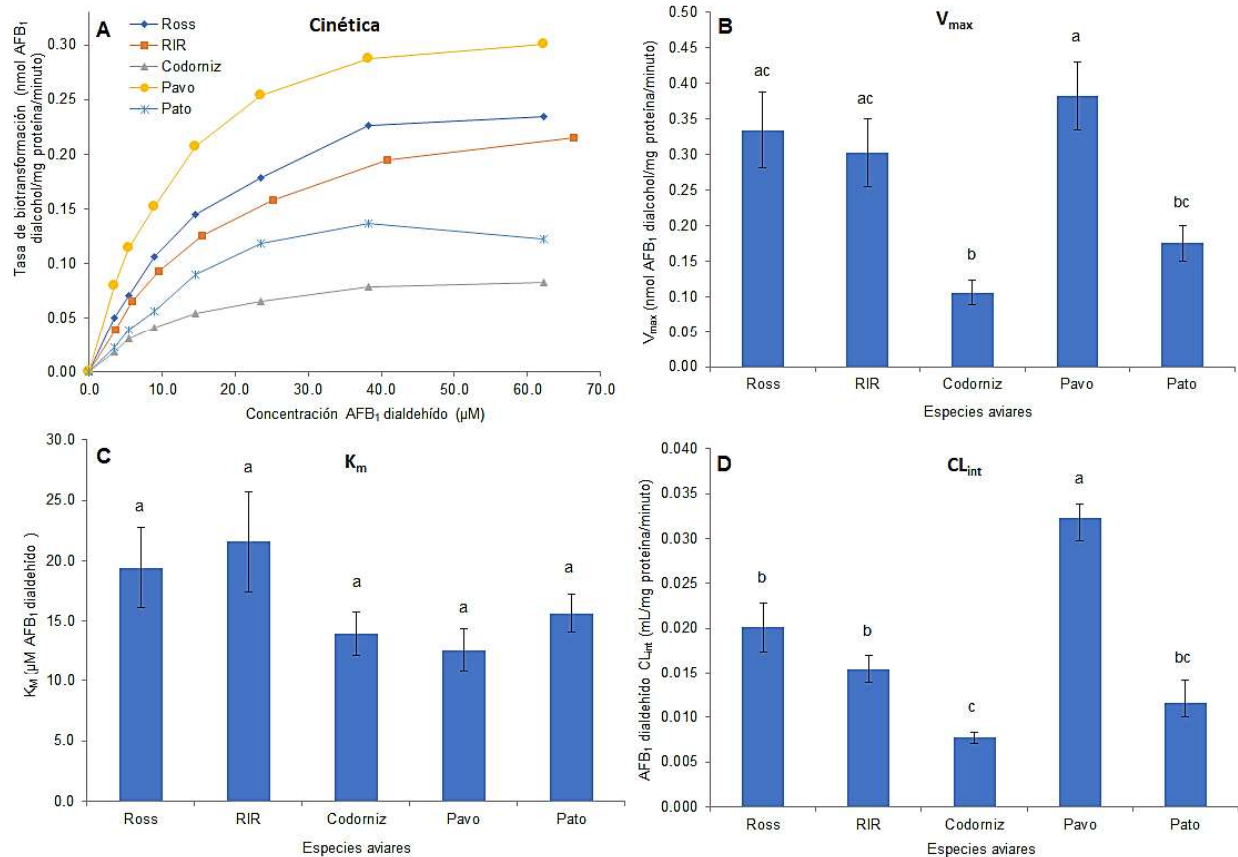


Figura 8. Producción de AFB₁ dialcohol en las razas de pollo, en el pavo, el pato y la codorniz. Se presenta la cinética enzimática (cinética de Michaelis-Menten) en un rango de concentración de 3.4 - 66.4 μM (A), la velocidad máxima (V_{max} - B), el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m - C) y el valor de la depuración intrínseca (CL_{int} - D). Los valores son estimados para 12 individuos por duplicado ± SD. Los valores con la misma letra no difieren significativamente. RIR: Rhode Island Red.

Tabla 1. Producción neta de AFB₁-dhd y AFB₁ monoalcohol en las especies aviares del estudio.

Especies	dhd/mono	dhd/dial	mono/dial
Ros	1.65 ± 0.80 ^a	2.77 ± 1.84 ^a	1.68 ± 0.68 ^a
RIR	4.01 ± 0.79 ^b	7.44 ± 2.37 ^b	1.90 ± 0.65 ^a
Codorniz	12.99 ± 7.79 ^c	19.92 ± 11.89 ^c	1.59 ± 0.63 ^a
Pavo	3.30 ± 1.55 ^b	3.89 ± 1.91 ^a	1.22 ± 0.30 ^a
Pato	99.20 ± 62.08 ^d	167.80 ± 105.57 ^d	1.92 ± 1.15 ^a

Se presenta el cociente del CL_{int} entre la producción AFB₁-dhd (dhd), producción AFB₁ monoalcohol (mono) y producción AFB₁ dialcohol (dial) en las razas de pollo, en el pavo, el pato y la codorniz. Los cálculos se realizaron para 12 individuos por especie. Se presenta cada valor ± SD. Especies con la misma letra no presentan diferencias significativas (p < 0.05).

Discusión.

Para entender la susceptibilidad de las especies estudiadas a los efectos adversos de la AFB₁ es necesario comparar los diferentes pasos del metabolismo de la AFB₁ según su proceso de bioactivación, inactivación (o neutralización) o de biodisponibilidad citosólica. En el caso de la producción de AFB₁-dhd (medida indirecta de la producción de AFBO) se observa que el pato epoxida

eficientemente la AFB₁ generando grandes cantidades de AFBO (valor alto del CL_{int}). Esto explica el por qué esta ruta de bioactivación genera un efecto genotóxico extremo en el pato, siendo esta especie aviar la única en desarrollar cáncer hepático [23]. Respecto a rutas de biodisponibilidad citosólica tenemos que la producción de AFL en el pollo aparentemente es una estrategia para mantener una concentración baja de AFB₁ en el cito-

sol y así una menor biodisponibilidad citosólica para su epoxidación a través de las enzimas CYP, lo cual explicaría parcialmente su resistencia a los efectos adversos de la micotoxina. A diferencia del pollo, la baja actividad AFB₁ reductasa en el pato (medido como el valor del CLint) mantendría una mayor proporción de la AFB₁ en el citosol para ser epoxidada y así tener una mayor producción de AFBO. Dentro de las rutas de inactivación se encuentra la conjugación con GSH que en el pato tiene una eficiencia menor que en las razas de pollo. Una alta tasa de epoxidación de la AFB₁ más una baja tasa de reducción de la AFB₁ a AFL y una baja tasa de conjugación con GSH permite entender el porqué de los efectos genotóxicos de la AFB₁ en el pato, a diferencia de las demás especies aviares. Otra ruta de inactivación es la que permite la neutralización de la aflatoxina B₁ dialdehído, la cual causa efectos citotóxicos por su aducción a las proteínas. Los resultados permiten evidenciar que las razas de pollo y el pavo son muy eficientes en eliminar la AFB₁ dialdehído, a diferencia del pato y la codorniz. Gracias a una alta actividad AFAR, estas especies pueden transformar este metabolito a formas no tóxicas como la AFB₁ monoalcohol o la AFB₁ dialcohol, y así evitar sus consecuencias citotóxicas. La baja actividad AFAR en el pato permitiría explicar el por qué de los efectos citotóxicos tan severos en esta especie aviar. La tabla 1 muestra como la producción neta de AFB₁-dhd es de 2 a 7 veces mayor que sus productos de detoxificación como la AFB₁ mono y dialcohol, lo cual señala la gran eficiencia de la actividad AFAR en las razas de pollo y el pavo. En contraste, la actividad AFAR es menos eficiente en la codorniz y muy poco eficiente en el pato, encontrándose una producción neta de AFB₁-dhd entre 13 y 167 veces mayor a la producción de AFB₁ mono y dialcohol. Por último, la producción de AFB₁ dialcohol se satura en todas las especies aviares debido a que la enzima AFAR debe hacer la reducción tanto de la AFB₁ monoalcohol (cuya proporción es de 1.2 a 1.9 veces mayor a la de AFB₁ dialcohol) como de la AFB₁ dialdehído.

Conclusiones. Los efectos agudos producidos en el pato por la AFB₁ son debidos principalmente por la alta actividad en la ruta de bioactivación, reflejada como una alta producción de AFBO, mientras la resistencia del pollo a los efectos de la AFB₁ esta explicada en parte por una menor biodisponibilidad citosólica de la AFB₁, que se ve reflejada como una mayor producción de AFL neto respecto a especies sensibles. Respecto a las reacciones de inactivación o de neutralización, una mayor eficiencia en la producción de AFB₁-GSH protege a las especies tolerantes como el pollo de los efectos de la AFB₁. Según esto, el desarrollo de hepatocarcinoma en el pato estaría relacionado con la gran eficiencia de la ruta de bioactivación y la baja eficiencia de la actividad GST como ruta de inactivación de la AFB₁. Por otra parte, la actividad AFAR, como una segunda ruta de neutralización, permite a las especies tolerantes como el pollo o de sensibilidad intermedia como el pavo disminuir los efectos citotóxicos causados por la AFB₁ dialdehído. La sensibilidad intermedia en la codorniz y el pavo se explicaría por la alta eficiencia en la detoxificación de la AFB₁ dialdehído mientras la codorniz presenta una mayor eficiencia en la actividad GST.

Agradecimientos. Profesor Leonardo Castellanos del grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia”. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Diamir Ariza, Micotox Ltda., Bogotá D.C. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COL-CIENCIAS. Convocatoria 647 “Doctorados Nacionales 2014”.

Conflicto de intereses y financiación. Los autores declaran no tener conflicto de intereses. El proyecto fue financiado con recursos generados por el Laboratorio de Toxicología y Nutrición Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Referencias

1. Wang, L.; Huang, Q.; Wu, J.; Wu, W.; Jiang, J.; Yan, H.; Huang, J.; Sun, Y.; Deng, Y. The Metabolism and Biotransformation of AFB1: Key Enzymes and Pathways. *Biochem Pharmacol* 2022, 199.
2. Gregorio, M.C. Di; Bordin, K.; Souto, P.C.M.D.C.; Corassin, C.H.; Oliveira, C.A.F. Comparative Biotransformation of Aflatoxin B1 in Swine, Domestic Fowls, and Humans. *Toxin Rev* 2015, 34, 142–150, doi:10.3109/15569543.2015.1091979.
3. Cullen, J.M.; Newberne, P.M. Acute Hepatotoxicity of Aflatoxins. In *The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary, and agricultural significance.*; Eaton, D.L., Groopman, J.D., Eds.; Academic Press Inc.: San diego, 1994; Vol. 1, pp. 3–26.
4. Chang, C.-F.; Hamilton, P.B. Experimental Aflatoxicosis in Young Japanese Quail. *Poult Sci* 1982, 61, 869–874, doi:https://doi.org/10.3382/ps.0610869.
5. Klvana, M.; Bren, U. Aflatoxin B1–Formamidopyrimidine DNA Adducts: Relationships between Structures, Free Energies, and Melting Temperatures. *Molecules* 2019, 24, doi:10.3390/molecules24010150.
6. Lootens, O.; De Boevre, M.; Gasthuys, E.; Van Bocxlaer, J.; Vermeulen, A.; De Saeger, S. Unraveling the Pharmacokinetics of Aflatoxin B1: In Vitro Determination of Michaelis–Menten Constants, Intrinsic Clearance and the Metabolic Contribution of CYP1A2 and CYP3A4 in Pooled Human Liver Microsomes. *Front Microbiol* 2022, 13, doi:10.3389/fmicb.2022.988083.
7. Lozano, M.C.; Diaz, G.J. Microsomal and Cytosolic Biotransformation of Aflatoxin B1 in Four Poultry Species. *Br Poult Sci* 2006, 47, 734–741, doi:10.1080/00071660601084390.
8. Mughal, M.J.; Peng, X.; Kamboh, A.A.; Zhou, Y.; Fang, J. Aflatoxin B1 Induced Systemic Toxicity in Poultry and Rescue Effects of Selenium and Zinc. *Biol Trace Elem Res* 2017, 178, 292–300.
9. Wang, Y.; Wang, X.; Li, Q. Aflatoxin B1 in Poultry Liver: Toxic Mechanism. *Toxicon* 2023, 233.
10. Renaud, J.B.; Walsh, J.P.; Sumarah, M.W. Simplified Synthesis and Stability Assessment of Aflatoxin B1-Lysine and Aflatoxin G1-Lysine. *Toxins (Basel)* 2022, 14, doi:10.3390/toxins14010056.
11. Renaud, J.B.; Walsh, J.P.; Sumarah, M.W. Optimization of Aflatoxin B1-Lysine Analysis for Public Health Exposure Studies. *Toxins (Basel)* 2022, 14, doi:10.3390/toxins14100672.
12. Wu, K.; Liu, M.; Wang, H.; Rajput, S.A.; Shan, Y.; Qi, D.; Wang, S. The Mechanism Underlying the Extreme Sensitivity of Duck to Aflatoxin B1. *Oxid Med Cell Longev* 2021, 2021.
13. Eaton, D.L.; Williams, D.E.; Coulombe, R.A. Species Differences in the Biotransformation of Aflatoxin B1: Primary Determinants of Relative Carcinogenic Potency in Different Animal Species. *Toxins* 2025, 17.
14. Wang, L.; Huang, Q.; Wu, J.; Wu, W.; Jiang, J.; Yan, H.; Huang, J.; Sun, Y.; Deng, Y. The Metabolism and Biotransformation of AFB1: Key Enzymes and Pathways. *Biochem Pharmacol* 2022, 199.
15. Rushing, B.R.; Selim, M.I. Aflatoxin B1: A Review on Metabolism, Toxicity, Occurrence in Food, Occupational Exposure, and Detoxification Methods. *Food and Chemical Toxicology* 2019, 124, 81–100.
16. Deng, J.; Zhao, L.; Zhang, N.Y.; Karrow, N.A.; Krumm, C.S.; Qi, D.S.; Sun, L.H. Aflatoxin B 1 Metabolism: Regulation by Phase I and II Metabolizing Enzymes and Chemoprotective Agents. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2018, 778, 79–89.
17. Dohnal, V.; Wu, Q.; Kuča, K. Metabolism of Aflatoxins: Key Enzymes and Interindividual as Well as Interspecies Differences. *Arch Toxicol* 2014, 88, 1635–1644.
18. Leenadevi, T.; Valsala, K. V; Rajan, A. Aflatoxin Induced Hepatocarcinogenesis in Ducks. *Mycotoxin Res* 1995, 2–8, doi:https://doi.org/10.1007/BF03192055.
19. Redinbaugh, M.G.; Turley, R.B. Adaptation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay for Use with Microtiter Plates and Sucrose Gradient Fractions. *Anal Biochem* 1986, 153, 267–271, doi:https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90091-6.
20. Humane Slaughter Association Sacrificio Práctico de Aves de Corral. Dislocación de Cuello Manual.
21. American Veterinary Medical Association *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Part II: Methods of Euthanasia. M3. Physical Methods. M3.6. Cervical Dislocation.*; Schaumburg, IL, 2013;
22. SAS/STAT SAS/STAT ® 14.3 User's Guide Introduction to Statistical Modeling with SAS/STAT Software; 2017;
23. Zhang, N.Y.; Qi, M.; Gao, X.; Zhao, L.; Liu, J.; Gu, C.Q.; Song, W.J.; Krumm, C.S.; Sun, L.H.; Qi, D.S. Response of the Hepatic Transcriptome to Aflatoxin B1 in Ducklings. *Toxicon* 2016, 111, 69–76, doi:10.1016/j.toxicon.2015.12.022.