



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Estudio de las aflatoxinas en alimento balanceado, de sus efectos adversos en una especie de pez autóctona de importancia para la acuicultura, el Pacú (*Piaractus mesopotamicus*), e identificación de biomarcadores empleando metabolómica”

Tesista:

Lic. Diego Cristos

Director:

Dr. Pedro Carriquiriborde

Codirector:

Dr. Sergio Vaudagna

Año:2022

RESUMEN

El pacú (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) es un pez característico de la Cuenca del Plata, la especie muestra excelentes tasas de crecimiento en las regiones tropicales y subtropicales de Latinoamérica, aspecto que, sumado a la posibilidad de utilizar insumos de bajo costo para la elaboración de su dieta, la vuelve una interesante opción para el desarrollo de la piscicultura y la convierte la segunda más importante en volumen de producción a nivel nacional. El incremento en el uso de materias primas de origen vegetal como sustitutos de proteína animal en los alimentos balanceados empleados en la acuicultura, implica que se deban contemplar nuevos riesgos y uno de ellos es la contaminación por micotoxinas. Estudios actuales demuestran que las micotoxinas afectan el crecimiento y causan patologías que afectan los rendimientos productivos, en diferentes especies empleadas en acuicultura y que los residuos de micotoxinas se pueden acumular en la carne de los peces, pudiendo afectar la salud de los consumidores.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la ocurrencia de aflatoxinas en alimentos balanceados utilizados en acuicultura en diferentes establecimientos de Sudamérica y evaluar, en ensayos de laboratorio, las consecuencias que la presencia de estas toxinas en el alimento puedan tener sobre su acumulación en los tejidos, los efectos tóxicos letales y subletales y el desempeño biológico del pacú y la calidad de su carne, buscando además, identificar biomarcadores de exposición y/o efecto específicos y no destructivos a nivel de los metabolitos plasmáticos. Para esto, por un lado, se evaluaron las frecuencias de detección y concentraciones de micotoxinas, en muestras de alimentos balanceados comerciales o elaborado por los propios productores, analizándolas, en relación con la diversidad de prácticas de producción en los diferentes establecimientos productores de pacú. Como resultado, se detectó la presencia de al menos una micotoxina, en el 27,6 % de las muestras comerciales evaluadas y el 66,7 % de las muestras elaboradas por los

propios productores. Entre las micotoxinas encontradas se detectaron tricotecenos y aflatoxinas, con valores promedio y máximos para AFB₁ de 80,9 y 320,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

A partir de las concentraciones encontradas en los alimentos, se diseñaron ensayos de laboratorio para evaluar la cinética de acumulación y detoxificación de la aflatoxina AFB₁ y su metabolito AFM₁. Se detectó que los residuos de estas sustancias en hígado alcanzaron un valor máximo cercano a 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AFB₁ y 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AFM₁, mientras que en músculo los residuos alcanzaron un valor máximo cercano a 0,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 0,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Estos valores se detectan independientemente de la dosis suministrada, aunque el tiempo necesario para alcanzar dicho equilibrio dependió de la dosis de aflatoxinas en el alimento. En particular los valores detectados en músculo, fueron inferiores a las referencias internacional para alimentos 4,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$. En estos experimentos, la fase de detoxificación y eliminación de la toxina indicó que la misma se metaboliza y elimina rápidamente dentro de las primeras 72 h de alimentación libre de AFB₁ y no es posible detectar valores de residuos de AFB₁ y AFM₁, con la metodología empleada, luego de 72hs.

Por otro lado, se evaluó si exposiciones agudas a altas concentraciones de AFB₁ podían inducir efectos letales para la especie. Los resultados indicaron que toxina no es capaz de inducir efectos letales sobre la especie a exposiciones de hasta 100000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ durante un periodo de 15 días. Estos hallazgos, ubicaron al pacú entre las especies del mundo más tolerantes a la AFB₁. En función de estos resultados y de las concentraciones medidas en las muestras de alimentos, se concluye que bajo condiciones normales de cría no serían esperables mortalidades en los peces producto del consumo de alimento contaminado con la toxina.

Luego, se estudió si exposiciones crónicas a concentraciones subletales podían afectar respuestas bioquímicas e histológicas que impactaran sobre factores productivos.

Los resultados mostraron que los peces expuestos bajo esta condición desarrollaron alteraciones a nivel histológico y bioquímico, que se correspondieron con daño hepático por aflatoxicosis y patologías hepáticas como hígado graso no alcohólico (HGNA/NAFLD). Pese al avanzado grado de desarrollo de estas patologías, las mismas no llegaron a afectar los índices de desempeño biológico en el tiempo evaluado, aunque si se detectaron alteraciones de parámetros comerciales como ser composición centesimal de carne, manifestadas como un aumento del contenido lipídico en músculo, que podría alterar la vida útil y la calidad sensorial del producto.

Finalmente, se realizó un estudio de los perfiles metabólicos del plasma de los peces expuestos crónicamente a través del alimento contaminado con AFB₁, con el fin de estudiar las vías metabólicas afectadas e identificar posibles biomarcadores de exposición. Sobre un total de 7763 iones identificados en ionización negativa y 3445 iones identificados en ionización positiva, 53 iones en total fueron seleccionados para ser propuestas como futuros biomarcadores de exposición a AFB₁ (17 en positivos y 36 en negativo). Entre las vías metabólicas alterada, la vía de síntesis lípidos fue una de las más afectadas. Los iones detectados, la identificación de intermediarios de la biosíntesis de L-carnitina y su peso estadístico en el modelo matemático desarrollado, ello explicaría la acumulación de lípidos a nivel hepático y muscular. A partir de las variaciones en las señales de los iones seleccionados se construyó un modelo matemático, que permitió identificar la exposición crónica a AFB₁ en concentraciones inferiores a los límites de detección habituales y que demuestra que las variaciones el perfil metabólico del plasma dependió de la concentración de toxina suministrada.

Como conclusión final, esta tesis demuestra que: i) las aflatoxinas son un contaminante común de los alimentos balanceados utilizados en acuicultura y que su incidencia es mayor en aquellos producidos por los propios productores; ii) las aflatoxinas poseen una baja capacidad de acumularse en la carne del Pacú dado que son

eficientemente metabolizadas y rápidamente eliminadas por los peces; iii) el pacú es muy tolerante a las aflatoxinas y su presencia en los alimentos balanceados no impactarían sobre la tasa de supervivencia de los ejemplares criados en establecimientos de acuicultura, en los tiempos de exposición estudiados (70 días); iv) las aflatoxinas inducen en el hígado del pacú efectos subletales a nivel bioquímico e histológico que a corto plazo se corresponden con mecanismos de compensación, pero que a largo plazo muestran síntomas de daño hepático generalizado, afectando parámetros de calidad de la carne, pero aun requiriendo de mayor tiempo de exposición para impactar sobre el desempeño biológico de los peces; v) la respuesta del metaboloma plasmático permitió detectar respuestas específicas que no sólo se condijeron con los efectos a nivel hepático y contribuyeron a explicar los cambios en la composición centesimal de la carne, sino que además permitió desarrollar un modelo para la detección de biomarcadores específicos y no destructivos para detectar en el Pacú, la exposición y los efectos a la Aflatoxina B₁ por la vía del alimento.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ÍNDICE.....	6
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
<i>¿Qué son las aflatoxinas y cuál el problema para la piscicultura?</i>	<i>9</i>
<i>La acuicultura a nivel mundial.....</i>	<i>15</i>
<i>Alimentos balanceados en la acuicultura</i>	<i>17</i>
<i>Alimentos y su influencia en la metabolización.....</i>	<i>18</i>
<i>Acuicultura en la Argentina</i>	<i>19</i>
<i>Oportunidades para el sector acuícola argentino</i>	<i>25</i>
<i>Bioacumulación y los productos de biotransformación.....</i>	<i>25</i>
HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL	29
METODOLOGÍA GENERAL DE INTERPRETACIÓN DEL DOCUMENTO.....	31
CAPÍTULO 1: OCURRENCIA: ESTUDIO DE LAS FRECUENCIAS Y NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE LA AFB₁ EN ALIMENTOS BALANCEADOS UTILIZADOS EN LA ACUICULTURA DEL PACÚ Y DE LA PERCEPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA POR EL PRODUCTOR.....	32
INTRODUCCIÓN	33
HIPÓTESIS ESPECÍFICA.....	36
OBJETIVOS PARTICULARES	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
<i>Estrategia experimental</i>	<i>37</i>
<i>Encuesta de evaluación sobre percepción del productor frente a las aflatoxinas.....</i>	<i>37</i>
<i>Análisis de contenido de aflatoxinas muestras de alimento balanceado.....</i>	<i>39</i>
RESULTADOS	41
<i>Resultados encuestas</i>	<i>41</i>
<i>Nivel de aflatoxinas en alimentos balanceados</i>	<i>46</i>
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES PARCIALES	51
CAPÍTULO 2: TOXICO CINÉTICA: ESTUDIO DE LA BIOACUMULACIÓN Y ELIMINACIÓN DE LA AFB₁ EN FUNCIÓN DEL TIEMPO	52
INTRODUCCIÓN	53
<i>Aflatoxinas, evaluación de riesgo para el consumidor, límites máximos.....</i>	<i>53</i>
<i>Estudios de bioacumulación de aflatoxinas en peces.....</i>	<i>55</i>
<i>Metabolismos de aflatoxinas en peces.....</i>	<i>56</i>
<i>Modelos toxicocinéticos (MTC).....</i>	<i>57</i>
<i>Pacú.....</i>	<i>58</i>
HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	60
OBJETIVOS PARTICULARES.....	60
MATERIALES Y MÉTODOS	61
<i>Estrategia experimental</i>	<i>61</i>
<i>Preparación de alimentos con adición de aflatoxina B₁ (AFB₁)</i>	<i>62</i>
<i>Estabilidad del alimento balanceado en agua (WSI).....</i>	<i>63</i>
<i>Descripción de los ensayos</i>	<i>64</i>
<i>Obtención de los organismos y aclimatación</i>	<i>65</i>
<i>Muestreo de los peces</i>	<i>68</i>
<i>Análisis de la acumulación de aflatoxinas en tejidos.....</i>	<i>68</i>

<i>Modelo MTC</i>	70
RESULTADOS	72
<i>Propiedades del alimento balanceado</i>	72
<i>Acumulación de residuos de AFB₁ en músculo e hígado</i>	73
<i>Parámetros de bioacumulación de residuos de AFB₁ en músculo e hígado</i>	77
<i>Eliminación de residuos de AFB₁ en músculo e hígado</i>	81
<i>Parámetros de Eliminación según modelo MTC para residuos de AFB₁ en músculo e hígado</i>	81
DISCUSIÓN	87
<i>Estabilidad del alimento</i>	87
<i>Acumulación de residuos de AFB₁ y metabolitos en los tejidos del Pacú y parámetros toxicocinéticos</i>	87
<i>Eliminación</i>	91
<i>Importancia de los residuos para el consumidor</i>	91
CONCLUSIONES PARCIALES	94
CAPÍTULO 3: TOXICODINÁMICA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS ADVERSOS INDUCIDOS POR EXPOSICIONES AGUDAS Y CRÓNICA DE AFB₁ EN EL ALIMENTO	95
INTRODUCCIÓN	96
<i>Susceptibilidad de las especies a aflatoxina, alteraciones hepáticas</i>	97
<i>Susceptibilidad de las especies a AFB₁, efectos sobre parámetros productivos</i>	100
<i>Efectos sobre la composición de la carne</i>	101
HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	103
OBJETIVOS PARTICULARES	104
MATERIALES Y MÉTODOS	105
<i>Estrategia experimental</i>	105
<i>Índices de desempeño productivo y parámetros condición</i>	108
<i>Histología</i>	110
<i>Respuestas biológicas a nivel bioquímico</i>	112
<i>Composición centesimal/análisis proximal de carnes</i>	116
<i>Análisis de datos</i>	119
RESULTADOS	121
<i>Efectos letales de AFB₁ en el alimento para el Pacú</i>	121
<i>Evaluación de hepatotoxicidad en juveniles de pacú expuestos a concentraciones subletales AFB₁</i>	121
<i>Efectos de AFB₁ sobre parámetros de desempeño biológico, índices de desempeño productivo, condición y calidad de carnes en estadios tempranos de producción</i>	144
<i>Efectos de AFB₁ sobre la calidad de carne (composición centesimal) del pacú</i>	149
DISCUSIÓN	152
<i>Letalidad de AFB₁ en el alimento para el Pacú</i>	152
<i>Indicadores de hepatotoxicidad</i>	153
<i>Parámetros de desempeño biológico, índices de desempeño productivo, condición y composición centesimal de carnes</i>	157
<i>Interrelación de los parámetros evaluados</i>	159
CONCLUSIONES PARCIALES	160
CAPÍTULO 4: METABOLÓMICA: IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS ESPECÍFICOS Y NO DESTRUCTIVOS, DE EXPOSICIÓN Y/O EFECTO, DISPARADOS POR LA CONTAMINACIÓN DEL ALIMENTO POR AFB₁	162
INTRODUCCIÓN	163
<i>Metabolómica</i>	163
<i>Fenotipado metabólico no dirigido</i>	164
XCMS	165

<i>Uso de animales en metabolómica</i>	167
HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	169
OBJETIVOS PARTICULARES	169
MATERIALES Y MÉTODOS	170
<i>Estrategia experimental</i>	170
<i>Preparación de la muestra</i>	170
<i>Análisis cromatográfico</i>	171
<i>Reprocesado de los cromatogramas</i>	172
<i>Curado de tabla de datos</i>	172
<i>Análisis multivariado de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS, partial least square)</i>	174
<i>Mapeo de rutas predictivas</i>	175
RESULTADOS	176
<i>Variaciones producidas en el perfil de metabolitos de bajo peso molecular en plasma de Pacú expuesto crónicamente por vía de la alimentación a concentraciones subletales de AFB₁</i>	176
<i>Tabla de datos y modelo predictivo</i>	179
<i>Selección de posibles moléculas a utilizar como biomarcadores</i>	181
<i>Rutas desreguladas</i>	184
DISCUSIÓN	192
<i>Perfil de metabolitos de bajo peso molecular, en plasma de Pacú, expuesto crónicamente por vía de la alimentación a concentraciones subletales de AFB₁</i>	192
<i>Biomarcadores y modelización</i>	194
CONCLUSIONES PARCIALES	196
DISCUSIÓN GENERAL	197
CONCLUSIÓN GENERAL	201
BIBLIOGRAFÍA	203
ANEXO: PROTOCOLOS	214
HISTOLOGÍA	214
XCMS	216
ANEXO: TABLAS	219
TABLAS CAPÍTULO 3 INDICADORES DE HEPATOTOXICIDAD	219
TABLAS CAPÍTULO 3 EFECTOS DE AFB ₁ SOBRE PARÁMETROS DE DESEMPEÑO BIOLÓGICO.....	223
TABLAS CAPÍTULO 4	224
ANEXO: ENSAYOS COMPLEMENTARIOS	228
<i>Análisis de residuos de aflatoxinas en músculo</i>	228
<i>Concentración de residuos de aflatoxinas en el músculo</i>	228

INTRODUCCIÓN GENERAL

¿Qué son las aflatoxinas y cuál el problema para la piscicultura?

Aflatoxinas

Las aflatoxinas son consideradas el grupo más importante de las micotoxinas en el suministro mundial de alimentos (Pitt and Hocking 2009). La presencia de aflatoxinas en los granos de maíz, trigo, arroz y maní cultivados en Sudamérica, entre otros productos utilizados para la preparación de alimentos para acuicultura ha aumentado en los últimos 10 años (Camiletti et al. 2017, Castañares et al. 2019).

Las aflatoxinas (AFs) (Figura I. 1) son metabolitos secundarios fúngicos producidos principalmente por los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* (Faulkner 2014). Químicamente, son derivados de la difurano-cumarina, fluorescentes bajo luz ultravioleta. Debido al color de la fluorescencia son divididas en AFB₁ y AFB₂, azules, (B de azul en inglés “blue”) y AFG₁ y AFG₂, verdes (G de verde en inglés “green”). Las AFM₁ y AFM₂, son metabolitos de las AFB₁ y AFB₂, presentes comúnmente en la leche (M de leche en inglés “milk”). Otros metabolitos importantes con la AFQ₁ y el aflatoxicol. Las AFs son el grupo de micotoxinas que han sido más estudiado debido a que han demostrado ser hepatotóxicas y carcinogénicas (principalmente hepatocarcinoma) tanto para animales de laboratorio como para el ganado, los animales domésticos y los seres humanos (Coppock et al. 2018). La AFB₁ es considerada la más potente y clasificada como Grupo 1, sustancia carcinogénica para humanos por la IARC (2012).

Las condiciones óptimas para la producción de AFs son de 33°C y un 0,99 aw (Sanchis and Magan 2004). Las AFs pueden ser producidas por hongos antes y/o después de la cosecha de cereales, su producción está afectada por de diversos factores ambientales, como la temperatura, la humedad relativa, daños causados por insectos, la sequía y condiciones de estrés de las plantas (Miraglia et al. 2008, Miraglia et al. 2009).

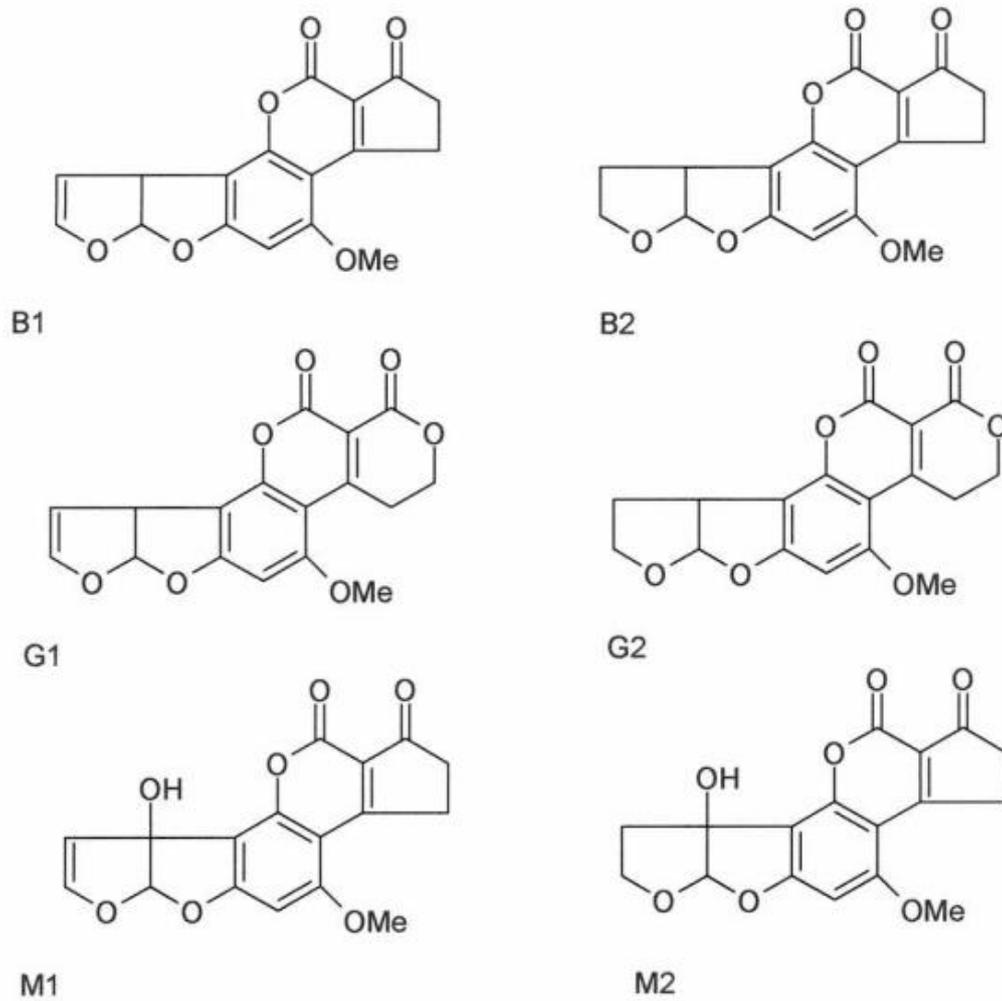


FIGURA I. 1. MOLÉCULAS DE AFLATOXINAS.

Problemática en la acuicultura:

El reciente aumento de los precios de los ingredientes para la preparación de los alimentos de los peces, aumenta la probabilidad de que en la búsqueda de fuentes más económicas por parte de los acuicultores genere la opción de comprar ingredientes y/o alimentos de menor calidad. En los últimos años, debido al rápido desarrollo de la industria acuícola mundial, se ha incrementado como sustituto de la harina de pescado, el uso de proteínas vegetales como fuente de proteínas en los piensos acuícolas comerciales, lo que ha llevado a un aumento del riesgo de contaminación por micotoxinas (Bu et al. 2017, FAO 2020). El amplio uso de piensos vegetales plantea riesgos para el crecimiento y la salud de los peces. Porque puede aumentar la potencial contaminación por micotoxinas en las dietas de los peces (Anater et al. 2016).

Contaminación en alimentos destinados a acuicultura: Micotoxinas

Estudios realizados por BIOMIN desde el año 2009, de un total de 45000 análisis realizados a nivel mundial, alertaban sobre la presencia de micotoxinas en los componentes de alimento para peces, e indicaban que el 74% de las muestras analizadas estaban contaminadas con al menos una micotoxina (Santos et al. 2010, Gonçalves et al. 2018b). Además, el uso de materias primas de origen vegetal como sustitutos de proteína y aceite de pescado en los alimentos acuícolas aumenta el riesgo de contaminación por micotoxinas. Las más relevantes, en función de la ubicuidad y toxicidad, son las aflatoxinas, la ocratoxina A, los tricotecenos (DON, toxina T-2), la zearalenona, las fumonisinas, y la moniliformina (Barug et al. 2004). A pesar del número limitado de estudios sobre el efecto de las micotoxinas en las especies acuícolas, cada vez hay más pruebas de que éstas pueden causar varias patologías y problemas de crecimiento en diferentes especies de peces (Gonçalves et al. 2018b).

En las reglamentaciones de zonas como el Mercosur, solo se regula aflatoxinas en leche, maíz y maní. Si bien la mayoría de los países tienen alguna regulación sobre el contenido de aflatoxinas totales, en general se da poca importancia a la presencia de micotoxinas en la alimentación animal, a diferencia de lo que sucede en la alimentación destinada al consumo directo de humanos, como muestran los numerosos informes de evaluación de exposición y toxicidad a nivel internacional (FAO 2004, CODEX 2006, EUR-Lex 2006, JECFA 2011, 2017, EFSA 2018a, Eskola et al. 2020).

Aflatoxinas, efectos sobre los peces:

Para la acuicultura, las aflatoxinas son de relevancia porque pueden representar pérdidas económicas debido a varias razones, desde la aptitud y calidad de los peces para consumo humano, como a pérdidas en el desempeño de la producción por los efectos tóxicos sobre la salud de los peces (Anater et al. 2016)

Los estudios disponibles sobre los efectos de la presencia de AFB₁ en los alimentos destinados para acuicultura, indican que se han documentado una gran cantidad de efectos sobre la salud y el rendimiento de los peces, entre los que se pueden mencionar reducción en las tasas de supervivencia y crecimiento, pérdida de ganancia de peso, comportamiento anormal, discoloración, genotoxicidad, carcinogénesis y teratogénesis, inmunosupresión y reducción del número de eritrocitos así como alteraciones de enzimas hepáticas (Santacroce et al. 2007, IARC 2012, Anater et al. 2016, Ostry et al. 2017). Los niveles de efecto observados en peces varían ampliamente dependiendo de la especie y la dosis evaluada, desde concentraciones de 5 µg kg⁻¹ (se ha observado reducción de supervivencia en *Oreochromis niloticus*) a 40.000 µg kg⁻¹ (se han observado alteraciones en los parámetros sanguíneos en *Labeo rohita*) (Gonçalves et al. 2018b, Gonçalves et al. 2020). La sensibilidad relativa entre especies pareciera estar vinculada en gran parte a la capacidad que cada una posee de bioactivar la AFB₁ a AFB₁-8,9-epóxido a nivel de las

monooxigenasas microsomales hepáticas (Dohnal et al. 2014). Ello induciría la formación de radicales libres que forman aductos con el ADN, resultando en el principal mecanismo de acción asociado a los efectos citotóxicos y genotóxicos que se le atribuyen a estas micotoxinas. A nivel metabólico, Perusia and Rodríguez Armesto (2004) indican que en general, las aflatoxinas interfieren en:

- Síntesis de las proteínas: interactúa con el ADN y la ARN polimerasa, inhibiendo la síntesis proteica a nivel del hepatocito.
- Síntesis de ácidos nucleicos: Como ya se mencionó, muchos de los efectos carcinogénicos y mutagénicos de las aflatoxinas, han sido relacionados con micotoxinas activadas metabólicamente. La unión covalente en el doble enlace en posición C 7-8 es lo que determina que la AFB₁ y AFG₁ sean más activas que la AFB₂ y AFG₂.
- Hidratos de carbono: las aflatoxinas disminuyen los niveles de glucógeno hepático debido a la inhibición de enzimas biosintéticas como la glucógeno-sintetasa; además producen un aumento de la actividad de las enzimas metabólicas de los precursores del glucógeno, como por ejemplo la NADP que reduce la enzima 6-fosfato deshidrogenasa.
- Lípidos: las aflatoxinas causan un aumento de los niveles NADP, necesarios para la síntesis de ácidos grasos, a su vez inhiben el transporte de triglicéridos, y afectan el transporte de fosfolípidos y colesterol, causando “hígado graso”. A nivel mitocondrial la AFB₁ inhibe el transporte de electrones entre citocromo b y citocromo c e impide que se complete la fosforilación oxidativa. El daño en la síntesis proteica y la disminución de facilidad del organismo para movilizar las grasas está relacionado aparentemente con la lesión hepática (necrosis y cambios grasos) que presentan los animales afectados de aflatoxicosis en forma precoz.

Es importante destacar que una alimentación prolongada con bajos niveles de AFB₁ puede generar que no sólo graves problemas de salud en los peces expuestos, sino que también representa un alto riesgo para los consumidores a través de residuos de AFB₁ en la musculatura de pescado (Santos et al. 2010).

Aflatoxicosis en humanos

Los efectos inducidos por la exposición aguda a dosis relativamente altas de AFB₁ se han explorado menos ampliamente. En los seres humanos, la exposición aguda a la AFB₁ se ha identificado a partir de brotes de aflatoxicosis descritos, en los que los síntomas clínicos que podrían estar asociados al consumo de alimentos contaminados con AFB₁ (Williams et al. 2004).

Más recientemente, se utilizaron biomarcadores para evaluar la exposición a la AFB₁ en individuos, por ejemplo, durante el brote de aflatoxicosis en Kenia en 2004, donde se registraron 317 casos y 125 muertes, o en el brote de Tanzania en el año 2016 con 68 casos y una tasa de mortalidad del 30%. Aflatoxicosis se refiere a la lesión hepática tóxica causada por aflatoxina, que presenta ictericia, hepatitis vómitos y dolor abdominal (Gilbert-Sandoval et al. 2020). Dependiendo de la exposición y la duración, se observan dos tipos de aflatoxicosis, la primera, que provoca un fallo hepático agudo, y la segunda es una intoxicación subletal con consecuencias nutricionales e inmunológicas nutricionales e inmunológicas. A partir de los informes sobre brotes reportados, las tasas de mortalidad en humanos con aflatoxicosis aguda, se estiman que oscilan entre el 27% y el 60%, siendo los niños más sensibles que los que los adultos (Kamala et al. 2018, Gilbert-Sandoval et al. 2020).

Normativa

La exposición a través de los alimentos de cualquier compuesto que implique un riesgo para la salud de los consumidores, debe mantenerse lo más baja posible. Por lo tanto, diferentes organizaciones, como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y organismos de control como Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) o Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA), han establecido regulaciones y pautas estrictas para garantizar la seguridad del consumidor. El límite de concentración para el contenido total de aflatoxinas (incluidas todas las formas B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁) es de 2 a 8 µg kg⁻¹ para aquellos alimentos que no son destinados a infantes exclusivamente, según lo descrito por la EFSA. El aumento de los límites permitidos a 8 y 10 µg kg⁻¹ fue discutido por el Panel Científico de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) en (2007), el cual concluyó que aumentar el límite máximo aumentaría considerablemente la concentración en los alimentos consumidos y consecuentemente aumentaría el riesgo para la salud de la población. Para productos como maní y derivados del maní, pistachos, almendras, semillas de sésamo y algodón, semillas de girasol, maíz, trigo, arroz y soja, se permite 20 µg kg⁻¹ de aflatoxinas, en la mayoría de los países.

La acuicultura a nivel mundial

Según el último informe de la FAO (2020) aproximadamente el 82% pescado consumido anualmente, es destinados a consumo humano directo mientras el resto es utilizados para la elaboración de harinas y aceites. Del total de consumo directo (115 millones de toneladas), el 53 % es producto de los establecimientos de acuicultura, y se espera que este porcentaje aumente en los próximos años.

El incremento de la demanda de pescado para el consumo humano favorece que la acuicultura se convierta en una actividad que desempeña un papel importante en la oferta de pescado mundial, y se considera a la acuicultura proporcionará un componente cada vez más relevante en el aporte mundial de proteínas de origen animal. De hecho, la acuicultura, ha sido el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento anual en los últimos 30 años (Hua et al. 2019). El incremento de la producción ha impulsado la necesidad de desarrollo de nuevas fórmulas de alimentación que mejoren la rentabilidad y sean más sustentables (Dirican 2015, Montoya-Camacho et al. 2019).

La mayoría de los autores coinciden en presentar a la acuicultura como uno de los sistemas más eficientes de transformación de energía, pero ponen el foco en que como contrapartida a la intensificación de los niveles de producción se sacrifica recursos naturales. (Bardach 1997, Valenti et al. 2011, FAO 2020)

En especial, el continente sudamericano es un actor importante en la exportación de la pesca y la acuicultura mundial, pero no ha alcanzado todo su potencial, siendo Chile y Brasil dos de los mayores productores de peces intensivos en el mundo. Ambos países tienen sistemas de producción totalmente distintos. Chile se basa principalmente en los peces marinos, mientras que Brasil se destaca por su producción continental. Un dato relevante, es que la producción continental de peces nativos está superando actualmente la producción de especies exóticas en algunos países, como ser Argentina, Bolivia, Brasil y Perú (Valladão et al. 2018)

La acuicultura como técnica de producción de alimentos es relativamente nueva en América Latina y representa una pequeña proporción de la producción mundial total de peces cultivados. Se espera que dicha región incremente los desarrollos de sistemas de producción acuícola y, en el futuro, contribuya con un rol más relevante en la producción mundial (Espinoza 2019).

Alimentos balanceados en la acuicultura

La mayoría de los análisis sobre sustentabilidad de los sistemas de producción intensivos de acuicultura, presentan la discusión sobre la alimentación acuícola como un punto dominante. Históricamente, el más importante de los recursos alimenticios para peces y crustáceos fueron los subproductos de la pesca: harinas y aceites de pescado. La creciente presión pesquera de mares y ríos con la consecuente y alarmante disminución de las capturas hizo que la producción de harinas y aceites de pescado comenzara a escasear, y generara la necesidad de buscar fuentes alternativas de proteínas (Naylor et al. 2009).

En la actualidad, uno de los principales componentes de las dietas para acuicultura son los ingredientes de origen vegetal, representando alrededor del 50% de las proteínas alternativas que hoy se utilizan. Las proteínas suelen ser el componente más costoso de los piensos para la acuicultura y contribuyen de manera significativa a los costos generales de producción. La proteína vegetal ha reemplazado a nivel mundial otras fuentes de proteínas, tales como la harina de pescado o aceite de pescado, de esta forma las empresas no solo buscan reducir costos en las materias primas, sino que también buscan insumos con alto contenido de proteínas que provengan de fuentes sustentables. (Al-Souti et al. 2019, Hua et al. 2019, Gonçalves et al. 2020).

En la Argentina, se detectó como una de las principales problemáticas en la producción acuícola, al precio del alimento balanceado, donde representa aproximadamente el 60% del costo de producción (Carciofi and Rossi 2021). Estudios en los últimos años en los cuales se han evaluado distintas fórmulas de dietas tanto pelletizadas como extruidas con las cuales pueden reducirse los costos alimentarios, si se compara con los productos comerciales disponibles actualmente en el mercado argentino (Wicki et al. 2003, Wicki et al. 2008, Sal et al. 2009, Sal et al. 2015).

Para lograr buenos resultados de crecimiento durante el período de cultivo, se hace necesario contar, no solo con un alimento balanceado que cumpla con los requerimientos nutricionales de la especie; sino que además, debe considerarse la cantidad y la forma en que el mismo es ofrecido a los animales durante su fase de engorde, a fin de regular su uso y maximizar las ganancias. Por este motivo, muchos productores consideran más adecuado elaborar su propio alimento, generando una base de conocimientos en esta temática.

Alimentos y su influencia en la metabolización

El empleo de alimentos balanceados con la composición adecuada según los requerimientos de cada especie contribuye a incrementar de forma importante los resultados productivos y las utilidades en los cultivos comerciales de organismos acuáticos, sin embargo, estos alimentos son costosos y pueden variar entre el 50 y el 70% del total de gastos de operación de la producción (Rana et al. 2009). Un alimento nutricionalmente balanceado no tendría valor alguno si no es consumido por la especie que se cultiva, por lo que la adición de atrayentes alimenticios incrementa la respuesta de la especie hacia un cierto alimento y reduce las pérdidas debido a una mala palatabilidad del mismo (Houlihan et al. 2008).

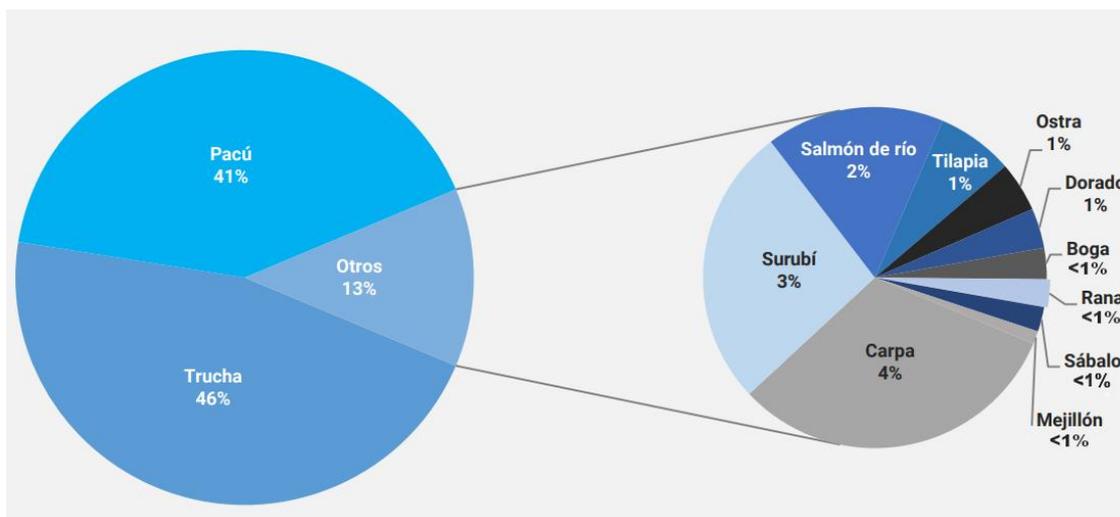
Un parámetro importante para el trabajo con peces de alimentación lenta es la estabilidad del alimento en el agua, ya que el alimento debe sumergirse durante horas con la mínima pérdida de nutrientes (Hoyos et al. 2017). Así mismo este parámetro es importante porque imita el patrón de desintegración del alimento en el tracto gastrointestinal (Aas et al. 2011, SØRensen 2012, Oehme et al. 2014). La estabilidad en agua se calcula como la diferencia porcentual de peso antes y después de la prueba, expresada como porcentaje de pérdida de materia seca (Fagbenro and Jauncey 1995).

Acuicultura en la Argentina

La actividad acuícola en Argentina puede considerarse como aún en vías de desarrollo con una producción anual de aproximadamente 4 mil toneladas anuales, alcanzando su máximo en el año en el 2014. La actividad acuícola comercial semi-industrial comenzó a crecer a partir de la década del '90. Los principales cultivos desarrollados en nuestro país son: Trucha arco iris, Pacú y moluscos bivalvos (ostión japonés y mejillón). La producción se completa con el cultivo de otras especies baja escala (acuicultura rural) y productos pesqueros provenientes de siembras extensivas (Carciofi and Rossi 2021).

En 2014, de acuerdo a los datos de la Dirección de Acuicultura del Ministerio de Agricultura, la producción acuícola de Argentina destinada al consumo directo alcanzó su máximo en el 2014, 4.027,7 toneladas, abarcando el cultivo 24 especies, incluyendo peces, moluscos bivalvos, reptiles y anfibios. La producción de Pacú y la Trucha representan el 85% del total (Figura I. 2), el resto corresponde a carpas, surubí, tilapia, pejerrey, esturión, yacaré, rana, mejillones, ostras, sábalos, boga, dorado y randia. En cuanto a la localización territorial de la producción, las provincias de Misiones y Neuquén son las de mayor participación relativa, contribuyendo con el 49,4% y 35% respectivamente a la producción nacional. Le siguen Chaco (6,3%) y Formosa (4,3%).

Entre las especies de peces de agua dulce cultivadas, el Pacú es la más extendida en el área noreste del país y es la más importante en volumen de producción en esta zona (2.119,2 tonelada en 2014), superando desde 2012 al 2019 al cultivo de Trucha que lideraba históricamente el sector nacional. Actualmente el Pacú representa el 45% de la producción acuícola nacional (Carciofi and Rossi 2021).



Fuente: Carciofi & Rossi, 2021

FIGURA I. 2. PRODUCCIÓN ACUÍCOLA EN ARGENTINA POR ESPECIE.

Las distintas producciones mencionadas emplean sistemas de cultivo totalmente diferentes. El cultivo de Trucha ha logrado un grado de desarrollo importante y los dos métodos de cultivos más utilizados es el uso de raceways construidos en cemento sobre tierra, para producción de carne a bajo tonelaje y el cultivo es intensivo mediante el uso de jaulas suspendidas en cuerpos de aguas provinciales, que son concesionados para este fin (MAGyP 2020).

El sistema de producción utilizado en la producción de moluscos bivalvos en el litoral marítimo, varía según el tipo de litoral y de especie. En la acuicultura del Pacú el perfil de los productores está conformado mayormente por pequeños minifundistas (especialmente en la zona norte del país) que incorporan la piscicultura como opción productiva para mejorar la rentabilidad del campo (FAO 2016). El principal sistema de cultivo es el semi- intensivo, en estanques excavados en tierra arcillosa de dimensiones variables (Figura I. 3).



FIGURA I. 3. SISTEMA DE PRODUCCIÓN MEDIANTE ESTANQUES. PROVINCIA ENTRE RÍOS.

Empresas

Hasta fines de 2020 existían 73 establecimientos productivos inscriptos en el Registro Nacional Único de Establecimientos de Acuicultura (RENACUA) y otros miles de productores de pequeña escala (en muchos casos familiares y artesanales) que no se encuentran inscriptos (Carciofi and Rossi 2021).

Los principales productores de Pacú, desarrollan la acuicultura como actividad complementaria, ya sea por diversificación o por las sinergias que presenta con su actividad principal. Por su parte, los frigoríficos y plantas de procesamiento que intervienen en esta cadena basa su actividad en productos pesqueros fundamentalmente pesca de captura y deben adaptar sus procesos para los acuícolas. Una situación análoga se presenta en el caso de los productores de alimentos balanceados, cuya mayor parte es para abastecer a otras industrias y la acuicultura es un cliente relativamente menor (Carciofi and Rossi 2021).

El Pacú

El Pacú (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) es un pez característico de la Cuenca del Plata, encontrándose en los ríos Paraná, Paraguay, Uruguay y de la Plata,

aunque la especie actualmente se la considera desaparecida de la parte baja de la cuenca. Es una especie con hábitos alimentarios omnívoros y tendencia a la herbívora. La especie conocida como Pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Presenta una dentición de tipo molariforme, especializada para el corte y molienda de los alimentos a ingerir, presentando un tubo digestivo relativamente largo lo que implica cuidados especiales en la alimentación y la amplitud térmica (Wicki et al. 2003).

Su cultivo se realiza en forma comercial en las provincias del noreste argentino desde la década del '90. Es una especie que se adapta al cultivo en zonas de clima templado-cálido, con temporadas de crecimiento durante las épocas estivales (primavera - verano). El período de mayor crecimiento para esta especie es de 180 a 240 días; dependiendo de la latitud del sitio seleccionado y el ciclo de cultivo es de 16 meses en áreas donde las temperaturas oscilen entre los 24 y 28°C. (Wicki et al. 2003). La especie muestra excelentes tasas de crecimiento en las regiones tropicales y subtropicales de Latinoamérica y la posibilidad de utilizar insumos de bajo costo para la elaboración de su dieta hace de la especie una interesante opción a la hora de escogerla para el desarrollo de la piscicultura (MAGyP 2010).

Entre las especies nativas el Pacú ha mostrado un incremento exponencial en los últimos años debido a la rápida tasa de crecimiento y a la gran cantidad de emprendimientos productivos de acuicultura rural de la zona. En los últimos años, la producción de Pacú ha registrado tasas de incremento que se encuentran entre las más altas reportadas para especies nativas a nivel mundial. Se han registrado aumentos de producción de hasta 17% anual en Brasil entre 2010 y 2012 (Brande 2019), y siendo las especies más cultivada en Argentina, Paraguay y Sur de Brasil desde 2014 (Carciofi and Rossi 2021).

El mercado del Pacú en Argentina es importante, ya que tiene elevada presencia en todas las provincias de la cuenca del río Paraná y Uruguay. Actualmente, se lo comercializa

entero eviscerado, en corte por mitades con piel y sin espinas, y también procesado como hamburguesa. Los restaurantes constituyen un buen mercado, principalmente en la región del Litoral Argentino. Las grandes cadenas de supermercados ofrecen el producto congelado en el resto del País (Figura I. 4) (Carciofi and Rossi 2021).



FIGURA I. 4. PRODUCTOS COMERCIALES OFRECIDOS EN ARGENTINA.

En Argentina, tres firmas del NEA concentran el 89% de la producción nacional de Pacú. Rosamonte y Romance, dos yerbateras que diversifican su producción tradicional con acuicultura, y el Grupo Puerto Las Palmas, que desarrolló un cultivo de rotación de arroz (su principal producto) con Pacú, utilizando un sistema semiintensivo en grandes estanques. El resto de la producción corresponde a pequeños acuicultores rurales.

En cuanto al destino de la producción de pacú se comercializa la totalidad en el mercado interno como pieza entera eviscerada (siendo el tamaño ideal de al menos 1,2 kg), de a mitades con piel y sin espinas, y en varias otras presentaciones como hamburguesas, filetes, nuggets, etc. Posee un mercado importante, y actualmente se lo puede encontrar en comercios prácticamente de casi todo el país. La única experiencia de exportación se realizó en el año 2016 a Bolivia en una cantidad limitada, mientras que recientemente se realizó un envío de muestras de pacú a Dubai (filetes y cortes premium), donde el producto fue bien recibido, aunque no llegaron al volumen mínimo necesario para poder realizar exportaciones periódicas, dado que su producción actual sería insuficiente para insertarse en el mercado internacional (Carciofi and Rossi 2021).

Oportunidades para el sector acuícola argentino

El alimento balanceado de acuicultura representa el 8% del total de la industria de alimento animal a nivel mundial (Boyd and McNevin 2022).

Argentina junto con Brasil y Paraguay representan el 70 % de la exportación mundial de harina y pellet de soja. Además, Argentina es el quinto exportador mundial de trigo y tercer exportador mundial de maíz (BCR 2020, USDA 2021). Es razonable pensar que países como Brasil, Argentina y Paraguay sean, actualmente o en un futuro, proveedores de buena parte de la proteína vegetal que utilizan los grandes productores de alimentos para acuicultura del mundo.

Debido a la variedad y cantidad de materias primas de origen vegetal para ofrecer, permite que se considere seriamente, el potencial de Argentina como exportador de alimentos balanceados con base en materias primas alternativas a las harinas de pescado.

Bioacumulación y los productos de biotransformación

La persistencia, el potencial de bioacumulación y la toxicidad de los productos de biotransformación han recibido una atención científica cada vez mayor en los últimos años. Se sabe poco sobre el destino biológico de los metabolitos de micotoxinas y otros contaminantes en general, en particular con respecto a su potencial bioacumulativo en la mayoría de los organismos.

Aunque se pueden realizar estudios estándar de bioacumulación en estos metabolitos directamente, tal enfoque puede ser ineficaz para aquellos metabolitos que requieren síntesis de laboratorio. Además, los protocolos estándar de bioacumulación pueden no ser adecuados para los metabolitos, porque se producen *in vivo* tras la exposición de la biota a los compuestos originales. Se necesitará un nuevo enfoque para evaluar el potencial de bioacumulación de metabolitos en organismos biológicos (Kuo and Chen 2016).

La biotransformación es un proceso importante para comprender y evaluar el destino de las sustancias químicas en los organismos vivos. Aunque se han realizado estudios de modelización sobre biotransformación, persisten las incertidumbres en la precisión, validez e interpretación de los modelos utilizados (Gonzalez 2006).

Biomarcadores

Un biomarcador se define como un parámetro fisiológico, bioquímico o anatómico que puede medirse *in vivo* y que refleja alguna característica específica de un proceso patológico. Los biomarcadores pueden basarse en características moleculares, histológicas, radiográficas o fisiológicas (Gómez-Arroyo 2011, Davis et al. 2020).

Idealmente, un biomarcador efectivo debe estar validado en casos confirmados y debe ser capaz de medir cambios en cortos periodos de tiempo para estudiar la progresión del problema a abordar (Nagana Gowda and Raftery 2013). Además, se espera que sea sensible, específico, reproducible, poco invasivo; y preferentemente simple y económico (Dhama et al. 2019). Silins y Högberg (2011) catalogan los biomarcadores en tres clases:

- Biomarcadores de exposición: involucran mediciones de compuestos parentales, metabolitos o aductos de ADN o proteínas y reflejan las dosis internas, la dosis biológicamente efectiva o la dosis objetivo, Idealmente deben ser específicos de las sustancias químicas de la exposición.
- Biomarcadores efecto: Se utilizan para reflejar cambios a nivel celular, como la expresión alterada de enzimas metabólicas, pero también pueden incluir marcadores de cambios patológicos tempranos en el desarrollo de enfermedades complejas, como mutaciones y lesiones preneoplásicas. No es un requisito excluyente que sean específicos del agente en cuestión, sino que reflejen al efecto buscado.

- Biomarcadores susceptibilidad: indican una capacidad constitutiva de un individuo para responder a exposiciones específicas.

En casos particulares, la clasificación planteada por los autores se superpone, por ejemplo, los aductos de ADN podrían usarse como biomarcadores de exposición, pero también pueden utilizarse para reflejar efectos.

La elección de la matriz también puede influir en el tiempo de exposición que reflejará un marcador. Los niveles de sustancias químicas en la sangre suelen reflejar un período de exposición corto (unas pocas horas o días), mientras que los niveles de aductos en las proteínas sanguíneas pueden reflejar un tiempo de exposición mucho más prolongado. (Watson and Mutti 2004). Los biomarcadores de tipo bioquímico, aquellos que pueden medirse en muestras biológicas, pueden ser medidos en el aire exhalado, pelo, sangre, orina y en muestras de tejido. Por lo general, el órgano o la célula diana real no está disponible para las mediciones o resultarían en análisis más invasivos o deletéreos.

La búsqueda de posibles biomarcadores de exposición a toxinas se ha enfocado tradicionalmente en el estudio de medición de enzimas específicas. Pero en los últimos 15 años, el desarrollo de las tecnologías “OMICAs” brindan nuevas posibilidades a la ecotoxicología, permitiendo estudiar respuestas biológicas con una visión holística ya sea a nivel del transcriptoma, proteoma y metaboloma (Martyniuk 2011). En particular la metabolómica permite evaluar simultáneamente cambios en el metaboloma, conjunto total de los metabolitos presentes en una célula, tejido, organismo o biofluido. Estos cambios son la última respuesta de un organismo a alteraciones genéticas, enfermedades o influencias ambientales, teniendo así mayor poder predictivo sobre cambios fenotípicos (Dettmer 2004, Beger 2011). Los perfiles metabólicos por su parte pueden ser utilizados como “huellas dactilares” para identificar exposición y/o efectos inducidos por contaminantes (Miller 2007). Ello permite el desarrollo de biomarcadores sensibles y

específicos, que han logrado mejorar significativamente el diagnóstico, mediante la detección de biomarcadores basados en moléculas pequeñas (metabolitos) (Zhang et al. 2015).

En el caso particular de las aflatoxinas, además de los estudios de casos en humanos, también se han caracterizado los efectos adversos de la exposición aguda a la AFB₁ en distintos modelos animales que muestran distintas sensibilidades según la especie animal, la cepa, el sexo y la edad de los mismos. Los estudios relevados indican que en las evaluaciones de la exposición a AFB₁ en los alimentos, el biomarcador de aducto de albúmina es el generalmente utilizado por los autores, pero el mismo presenta incertidumbre y estaría asociado principalmente con la exposición crónica, presentando gran variabilidad en exposiciones agudas a la AFB₁. Para las exposiciones agudas, la medición de la AFM₁ o la aflatoxina-N₇-guanina se consideran mejores indicadores.

HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL

De acuerdo con lo argumentado en los párrafos precedentes, sobre el potencial de la producción acuícola Argentina, y los riesgos asociados a las aflatoxinas tanto para los consumidores como para el impacto en la producción, se plantea la siguiente hipótesis, de estudio,

Las aflatoxinas, a concentraciones habitualmente encontradas en los alimentos balanceados para peces, afectan adversamente el desempeño biológico de los peces y ello puede ser detectado tempranamente a través de biomarcadores basados en la metabolómica.

El objetivo general de trabajo en relación con la hipótesis planteada es:

Evaluar el impacto que pudiese generar la presencia de aflatoxinas en el alimento balanceado sobre el desempeño biológico en Pacú, especie de importancia para la acuicultura argentina e identificar biomarcadores de exposición y/o efectos específicos a nivel metabólico.

Para ello se establecen los siguientes objetivos particulares

- *Evaluar la percepción del productor sobre la incidencia de las micotoxinas en los alimentos balanceados y sus efectos en los peces de establecimientos acuícolas destinados a la producción de Pacú (*P. mesopotamicus*) y determinar la ocurrencia y las concentraciones de aflatoxinas en alimentos balanceados utilizados en acuicultura en la región.*
 - *Evaluar la cinética de acumulación y detoxificación de la aflatoxina AFB₁ y su metabolito AFM₁ en músculo e hígado del Pacú expuesto de forma crónica a concentraciones subletales de AFB₁ a través del alimento.*
 - *Evaluar las concentraciones de AFB₁ en el alimento que producen efectos adversos sobre parámetros de desempeño biológico (supervivencia, crecimiento malformaciones, discoloración, etc.) de relevancia para la acuicultura, en estadios tempranos de desarrollo de Pacú y compararlo con respuestas a nivel bioquímico e histológico que permitan caracterizar tempranamente los efectos tóxicos inducidos sobre el Pacú.*
 - *Utilizar las potentes herramientas de análisis provistas por las nuevas tecnologías ÓMICAs, particularmente la metabolómica, para identificar respuestas específicas a nivel de los metabolitos plasmáticos que puedan ser utilizadas como biomarcadores no destructivos y específicos de exposición/efecto a AFB₁.*
-

Metodología general de interpretación del documento

La metodología de trabajo se plantea en cuatro bloques conceptuales:

- i) Estudio de la incidencia de AFB₁ en alimentos balanceados para peces obtenidos de establecimientos que practican la acuicultura del Pacú y la percepción del productor.
- ii) Estimación de bioacumulación/eliminación de residuos de aflatoxina en músculo de Pacú.
- iii) Determinación de las dosis letales (LD₅₀) y concentraciones efectivas (ED₅₀) sobre el crecimiento, malformaciones, discoloración, etc. en estadios juveniles de Pacú (*P. mesopotamicus*) expuestos a AFB₁. Evaluación de respuestas a nivel bioquímico, como el sistema de biotransformación (ej. EROD) e histológico sobre el hígado de la especie mencionada expuestos a niveles subletales.
- iv) Identificación de respuestas metabólicas globales específicas a nivel del plasma de los juveniles de Pacú.

CAPÍTULO 1:

Ocurrencia: Estudio de las frecuencias y niveles de concentración de la AFB₁ en alimentos balanceados utilizados en la acuicultura del Pacú y de la percepción de la problemática por el productor

Introducción

El pescado y sus productos son los alimentos más comercializados en el mundo debido principalmente a la disponibilidad, el acceso y precio en relación con el consumo de carne de vacuno, cerdo y aves de corral (Anater et al. 2016, FAO 2020).

En particular, la acuicultura rural o artesanal, es una constante en países poco desarrollados o en vías de desarrollo, donde la acuicultura es una actividad complementaria, principalmente para proporcionar ingresos extra y alimentos al productor. Entre algunas de las características de estos sistemas de producción, se suele utilizar alimentos fabricados en las mismas instalaciones o en establecimientos con escaso control sobre micotoxinas en sus productos (Mulokozi et al. 2020).

A pesar de diversas precauciones, la contaminación por micotoxinas en los piensos podría ser inevitable. Además, los efectos adversos causados por las micotoxinas podrían aliviarse solo en parte, pero no eliminarse por completo (Alinezhad 2017, Hussain 2017).

Por su parte, la producción de piensos destinados a acuicultura, se presenta como la actividad de mayor crecimiento respecto a otros sectores dedicados a la producción de alimentos a nivel mundial (FAO 2018, 2020) con una producción de 41 millones de toneladas a nivel mundial en el 2020, abarca el 4% del mercado mundial de alimentación animal. Actualmente, este mercado no se considera relevante por el momento en nuestro país, pero la capacidad instalada y el potencial debido a las producciones primarias de la región, indicaría que esta realidad puede modificarse en los próximos años.

Desde el año 2011 BIOMINT, publica anualmente datos de incidencia de micotoxinas en piensos para alimentación animal e insumos para su fabricación, entre los que se encuentran los utilizados en acuicultura (Gruber-Dorninger et al. 2019).

Del relevamiento realizado en 2020 a nivel mundial por BIOMIN (2021), las micotoxinas más relevantes en función a su incidencia fueron: deoxinivalenol (65%), fumonisinas (64%), zearalenona (48%) y las aflatoxinas (28%). Para el caso particular de

Sudamérica el estudio considero a la región zona de riesgo severo, debido a que el maíz se detectó contaminado con fumonisinas en un 83%, en el trigo se detectó deoxinivalenol en el 83% de las muestras analizadas, mientras que en la soja se vio afectada principalmente por zearalenona en el 73% de las muestras evaluadas. Por su parte las aflatoxinas, se encontraron presente en el 30% de los insumos y alimentos evaluados, presentando un incremento del 12% respecto al 2019, siendo el único grupo de las micotoxinas relevantes, que incremento su incidencia.

Considerando, el incremento en los niveles detectados a nivel continental y la incidencia reportada en las muestras evaluadas, se debería prestar atención a los niveles de aflatoxina en alimentos, debido a su toxicidad y los efectos ya mencionados en la producción.

Por su parte las producciones de Pacú, como se explicó, se caracterizan por pequeños minifundistas, que en general adquieren los alimentos a productoras locales, debido al escaso volumen, comparado a otros mercados. Son escasos los estudios en nuestro país sobre efectos de las micotoxinas en especies autóctonas, y considerando que la percepción de un riesgo debe ser entendida, como toda condición que experimenta el hombre en cuanto se relaciona con su medio circundante y con la sociedad que le rodea, para el productor, esta percepción no se constituiría en un riesgo hasta el momento en que afecte su bienestar o cuando desequilibran su relación con el trabajo o el entorno. Por tanto, la falta de información respecto a la problemática atentaría directamente contra dicha percepción.

No se han hallado publicados trabajos sobre la presencia de aflatoxinas en alimentos balanceados específicamente destinados a la alimentación de Pacú. De acuerdo con los antecedentes mencionados, la percepción de los productores respecto a las micotoxinas, y la ocurrencia de aflatoxinas reportada en alimentos balanceados utilizados en la región, se plantea la siguiente hipótesis.

Hipótesis específica

- *El desconocimiento de la problemática por parte de los productores, sumado a la falta de fiscalización conduce a que la incidencia de aflatoxinas en los alimentos balanceados utilizados en acuicultura en la región sean superiores a los reportados para los insumos utilizados para la fabricación de estos.*

Objetivos particulares

- *Evaluar la percepción del productor respecto de la incidencia de las micotoxinas en los alimentos balanceados y sus efectos en los peces de establecimientos acuícolas destinados a la producción de Pacú.*
- *Determinar la ocurrencia y las concentraciones de aflatoxinas en alimentos balanceados utilizados en acuicultura en la región.*

Materiales y métodos

Estrategia experimental

En el presente capítulo se planteó evaluar la percepción de los productores respecto a las aflatoxinas. Para este fin se realizaron entrevistas personales y se recolectaron datos mediante una encuesta a establecimientos de productores de Pacú, en Argentina, Bolivia, Paraguay, Bolivia y Perú. En Argentina las encuestas recolectadas fueron de las provincias de Misiones, Corrientes, Chaco, Formosa y Entre Ríos

A fin de evaluar el segundo objetivo planteado, se recolectaron muestras de alimento balanceado en los establecimientos de los productores entrevistados y se adquirieron alimentos balanceados disponibles en el mercado para la producción de Pacú. Todas las muestras recolectadas fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, con el fin de evaluar la presencia de micotoxinas.

Encuesta de evaluación sobre percepción del productor frente a las aflatoxinas

Para el diseño se siguieron las recomendaciones y pautas del manual “Estadísticas sobre Costos de Producción Agrícola Lineamientos para la Recolección, Compilación y difusión de datos (FAO 2016).

El encabezado de la encuesta elaborada se muestra en la Figura 1.1.

Efectos adversos de las micotoxinas en la producción de Pacu.

Buenos días/tardes,

En esta oportunidad nos dirigimos a usted con el objeto de realizar una encuesta para evaluar la presencia de micotoxinas en alimentos destinados a la acuicultura.

La contaminación de alimentos balanceados con micotoxinas pueden representar pérdidas económicas en su producción debido a varias razones, desde la aptitud y calidad de los peces para consumo humano, como pérdidas en el desempeño de la producción por los efectos tóxicos sobre la salud de los peces.

Se han documentado una gran cantidad de efectos sobre la salud y el rendimiento de los peces, entre los que se pueden mencionar reducción en las tasas de supervivencia y crecimiento, pérdida de ganancia de peso, comportamiento anormal, discoloración y alteraciones hepáticas entre otros.

Para evaluar las posibles pérdidas económicas producidas por micotoxinas en la producción se requiere conocer, por un lado, la concentración de micotoxinas en los alimentos, y por el otro, los sistemas de manejo y control habituales dentro de la planta de

FIGURA 1. 1. IMAGEN ENCUESTA A PRODUCTORES GOOGLEFORM.

La encuesta estuvo compuesta de 14 preguntas y los datos recolectados, se enfocaban en recolectar información sobre:

- Condiciones de comercialización, preparación y almacenado de lo alimentos balanceados,
- Problemáticas comunes en la producción de Pacú,
- Conocimiento y percepción del productor, acerca de las micotoxinas y sus efectos en la acuicultura.

La participación en las encuestas fue voluntaria y el uso de los datos totalmente confidencial, haciéndose público, únicamente el resultado de la exposición poblacional, según lo acordado con los productores. La misma fue realizada mediante un formulario de la plataforma GoogleForm (<https://forms.gle/ihb9xNF99wzMot6H9>).

Al el completar el formulario, los productores recibieron una dirección de mail, para coordinar él envió de alimento balanceado, como tomar una muestra representativa y resguardarla para el envió al laboratorio la para el análisis de presencia de micotoxinas.

Análisis de contenido de aflatoxinas muestras de alimento balanceado

Las muestras de alimento balanceado fueron purificadas y concentradas con métodos desarrollados previamente en el laboratorio de contaminantes químicos del Instituto de Tecnología de Alimentos de INTA (ITA-CIA-INTA) para la detección de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ y AFM₁ y tricotecenos tipo B en alimentos balanceados (AB) y piensos (Alvarez et al. 2019, Castañares et al. 2019). Se pesaron 10 gr de granos de AB y fueron extraídos con 20 ml de solvente (acetonitrilo/agua/ácido-acético 79+20+1). Las muestras se homogenizaron utilizando un molino estilo “Ultraturrax” durante 3 minutos y luego se sonicaron por 60 minutos para favorecer la extracción. Luego se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 3000 rpm y se tomaron 10 ml del sobrenadante, el cual fue evaporado hasta sequedad bajo flujo de nitrógeno a temperatura controlada de 45 °C en baño seco. La muestra fue resuspendida en 200 µl de metanol/agua 70/30 y filtrado a través de membrana de nylon de 0.22µm antes de su análisis cromatográfico.

La detección y cuantificación de las micotoxinas fue realizada mediante un equipo cromatografía líquida de alta performance (HPLC) acoplado a espectrometría de masas, de acuerdo con el trabajo de Arroyo-Manzanares et al. (2015), con modificaciones menores.

Las muestras se analizaron mediante HPLC Thermo Survey acoplado a espectrómetro de masas de trampa lineal, Thermo LTQ XL. La ionización de las muestras se realizó en una fuente de ionización por electrospray (ESI) utilizando modo de ionización positivo para Aflatoxinas y modo de ionización negativo para tricotecenos y empleando la modalidad de escaneo MRM. Como criterios de identificación se utilizaron el tiempo de retención y la relación entre la abundancia del ion de confirmación (Ion C) y la del ion de cuantificación (Ion Q). La separación cromatográfica se realizó con una columna C₁₈ Hypersil™ ODS de 100 mm de longitud, 2,1 mm de diámetro y 3.5 µm de tamaño de partícula. Las muestras (10 µL de inyección) se analizaron a un flujo de 0,2

mL/min a 45 °C. Se utilizó una solución de formiato de amonio (10 mM) y acetonitrilo como fase móvil con el siguiente gradiente: (95:5)-(95:5) 0-2 min, (95:5)-(80:20) 2-5 min, (80:20)-(20:80) 5-10 min, (20:80)-(0:100) 10-11 min, (0:100)-(0:100) 11-13 min, (0:100)-(95:5) 13-14 min, (95:5) 14-20 min. La determinación cuantitativa se realizó utilizando estándares de Sigma-Aldrich: i) estándar de mezcla de tricotecenos B (número de parte: 34134), ii) estándar de mezcla de aflatoxinas (número de parte 33415) y estándar de aflatoxina M₁ (número de parte: 34031).

Los límites de cuantificación analítico (LQA) y límites de detección analítico (LDA) expresados en µg kg⁻¹ fueron:

- AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂: LDA 0,03 LQA 0,10
- AFM₁: LDA 3,00 LQA 10,00
- 3 acetil deoxinivalenol(3-AcDON), deoxinivalenol (DON), 15 acetil deoxinivalenol(15-AcDON): LDA 1,00 LQA 5,00
- Nivalenol (Niv): LDA 10,00 LQA 30,00

La metodología aplicada fue previamente evaluada según los parámetros obtenidos del marco legal europeo, referido al funcionamiento de métodos analíticos aplicables al control de alimentos (Decisión 2002/657/EC). Para esto, se realizaron ensayos cuyo propósito fue evaluar selectividad, linealidad, exactitud, precisión y sensibilidad, según los procedimientos establecidos previamente en el laboratorio de contaminantes químicos del Instituto de Tecnología de Alimentos de INTA (ITA-CIA-INTA).

Durante los análisis, se utilizaron muestras blanco de alimento balanceados a las cuales se le adiciono concentraciones conocidas de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, AFM₁ y tricotecenos tipo B para la construcción de curvas de calibración en matriz y la evaluación de las recuperaciones y las interferencias de matriz (supresión y/o exaltación iónica).

Resultados

Resultados encuestas

Del análisis de las preguntas realizadas en las encuestas a productores, se obtuvieron datos en el periodo comprendido, entre agosto de 2016 y diciembre 2020, de 27 establecimientos productivos. Las regiones evaluadas corresponden a establecimientos ubicados en: Perú (Iquitos, Tacna, Tarapoto, Ucayali, Chanchamayo y Puno), Bolivia (El Beni), Paraguay (Caapucú, Juan Emiliano O'Leary, Itapúa) Colombia (Popayán) y Argentina (Entre Ríos, Chaco, Santa Fe, Formosa, Corrientes, Misiones) como se observa en el mapa correspondiente a la Figura 1. 2.



FIGURA 1.2. MAPA DE UBICACIÓN DE ESTABLECIMIENTOS ENCUESTADOS

El perfil de los establecimientos encuestados correspondía a 96,4% de productores de cría semi intensiva en estanque, que realizan la etapa de recría y engorde en estanques en tierra. El 96,2% de los encuestados indicaron que su establecimiento poseía un lugar techado específico para el almacenaje del alimento balanceado, aunque las condiciones dentro de este grupo variaban bastante. El 69,2 % de los establecimientos poseía un lugar destinado para el acopio de alimento con paredes, ventanas y pisos recubierto de algún material como ser cemento/baldosa/cerámicos/epoxi. El 23% poseía sistemas de aireadores y el 11,5% poseía temperatura controlada en el cuarto. El 7,7% poseía también sistemas de humedad controlada.

El 29,6 % de los entrevistados indicó que preparaban sus propios alimentos balanceados, mientras que el resto compraba el mismo a proveedores locales. De los productores que indicaron preparar su propio alimento, utilizaban como principales insumos:

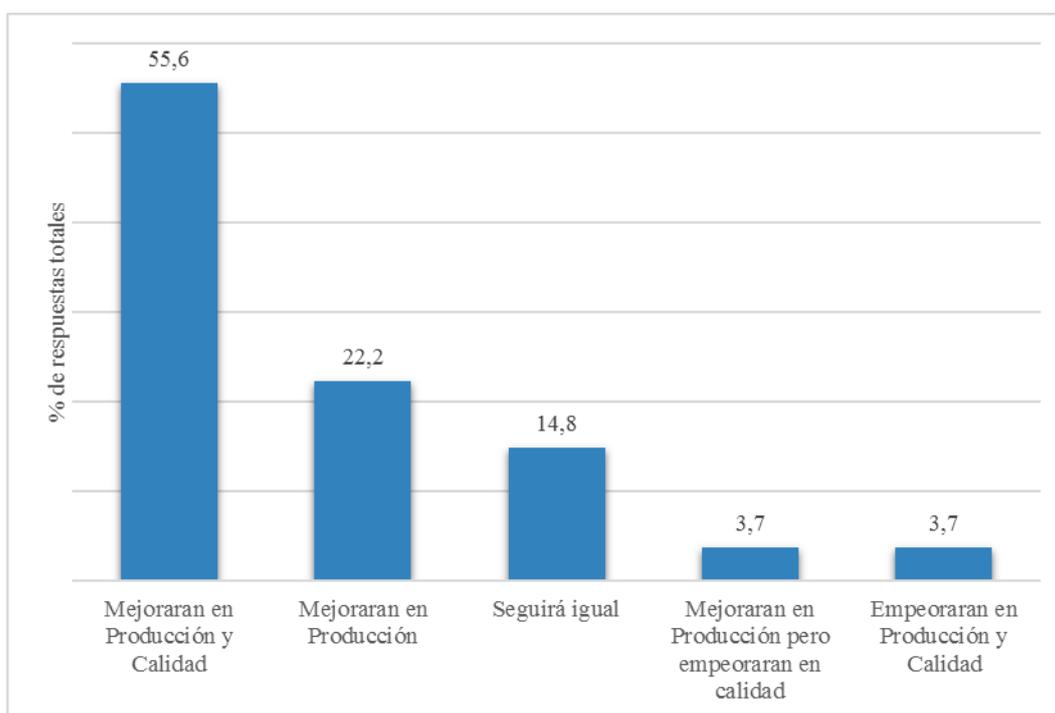
- Pellet de soja o harina de soja
- Afrecho de arroz
- Afrecho de trigo
- Maíz
- Harina de carne y hueso
- Núcleos proteicos
- Descarte huerta (zanahoria, zapallo, tomate)
- Frutas y semillas
- Harina de pescado
- Restos de faena de peces y pollos, maíz, ácido fórmico y núcleos proteicos

Solo el 11 % de los productores encuestados indicó utilizar secuestrantes contra micotoxinas junto con los alimentos balanceados y el 65,4 % de los encuestados

desconocían la existencia de los secuestrantes contra micotoxinas o sólo habían escuchado hablar de ellos.

Entre las principales complicaciones en la producción del alimento balanceado, el 55,6 % de los productores indicó que tenía problemas para: i) conseguir homogeneidad de las materias primas entre distintas partidas, ii) lograr un abastecimiento continuo de insumos y iii) que la calidad de los insumos cumpliera siempre con los estándares mínimos establecidos por ellos. Un 44,4 % mencionó que en algunas épocas del año se dificultaba la obtención de materias primas y el 11,1% indicó tener problemas en la trazabilidad de los insumos.

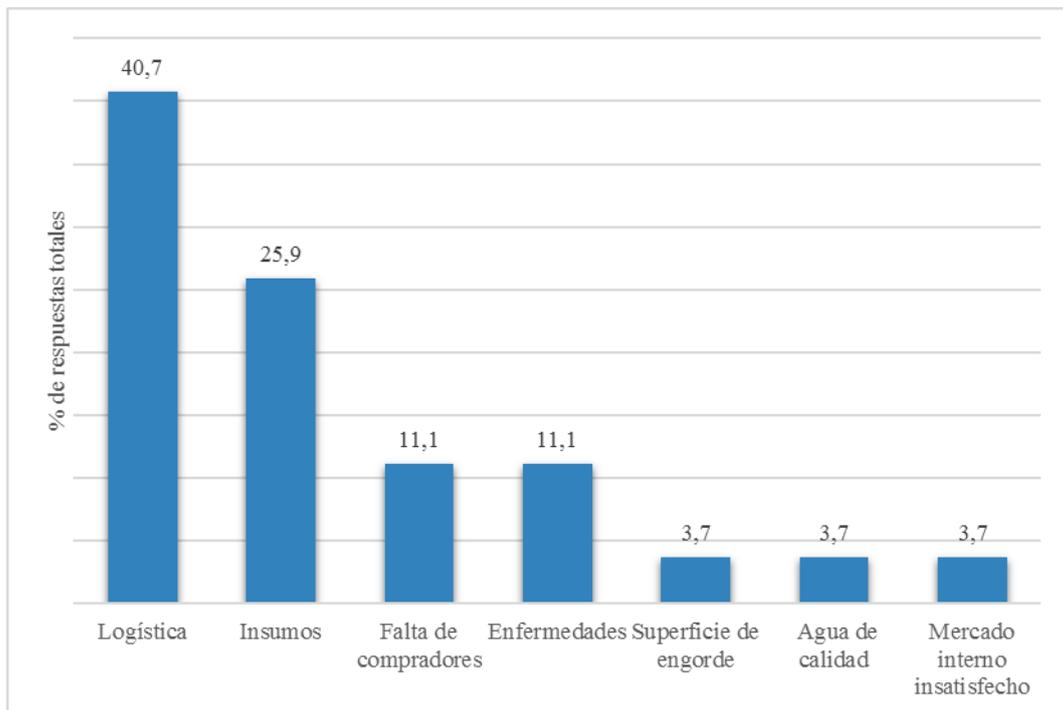
La mayor parte de los productores encuestados esperan, a futuro, que el desempeño de las empresas proveedoras de alimentos e insumos para la especie mejoren en calidad y producción, debido a la relevancia que en Sudamérica está tomando la cría del Pacú, como se puede observar en el Figura 1.3.



Establecimientos relevados: 27. Valores expresados en porcentaje de productores encuestados

FIGURA 1.3. RELEVAMIENTO DE PERCEPCIÓN DEL PRODUCTOR, SOBRE EL DESEMPEÑO A FUTURO DE LAS EMPRESAS PROVEEDORAS DE ALIMENTOS E INSUMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PACÚ

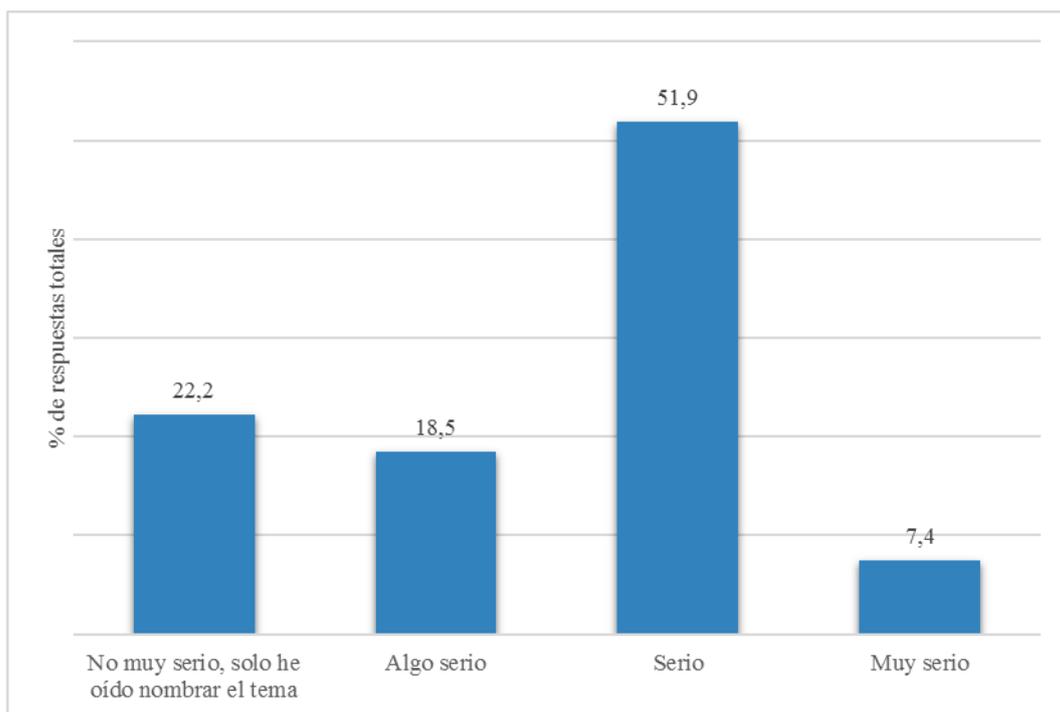
Entre las principales problemáticas identificadas, los productores indicaron en un 40,7 % que la logística es uno de las principales inconvenientes para el desarrollo de la producción según su percepción, mientras que la calidad de los insumos fue la principal preocupación para el 25,9 % de los productores (Figura 1.4.). La falta de compradores, las enfermedades, el mercado interno y la calidad del agua, fueron otras de las preocupaciones relevantes señaladas por los productores.



Establecimientos relevados: 27. Valores expresados en porcentaje de productores encuestados

FIGURA 1.4. RELEVAMIENTO DE PERCEPCIÓN DEL PRODUCTOR, SOBRE PRINCIPALES INCONVENIENTES Y OBSTÁCULOS PARA EL DESARROLLO DE LA PRODUCCIÓN DE PACÚ

Considerando que un porcentaje significativo de los productores encuestados expreso preocupación por la calidad de los insumos, se indagó respecto al conocimiento sobre las micotoxinas y su relación con la producción acuícola. El 92,6 % de los productores conocían sobre la existencia de las micotoxinas y el 51 % de los productores encuestados consideraban a la presencia de las micotoxinas como “Un Problema Serio” en su producción. Sólo el 22,2 % consideró a esta problemática como no muy seria (Figura 1. 5).



Establecimientos relevados: 27. Valores expresados en porcentaje de productores encuestados

FIGURA 1.5. PERCEPCIÓN DEL PRODUCTOR, SOBRE PROBLEMÁTICA DE LA PRESENCIA DE LAS MICOTOXINAS EN ALIMENTOS DESTINADOS ACUICULTURA

Por su parte, el 75 % de los productores encuestados indicaron haber tenido, en algún momento, problemas en su producción debido a la disminución de la tasa de crecimiento, mortandad inusual de peces o ataque por enfermedades.

El 85 % de los encuestados nunca informaron haber realizado mediciones de micotoxinas en sus insumos o alimentos, mientras de los que realizaron análisis un 25% detectaron valores positivos.

Nivel de aflatoxinas en alimentos balanceados

Del análisis del análisis de los alimentos balanceados, se obtuvieron datos en el periodo comprendido, entre agosto de 2016 y diciembre 2021, de 35 muestras. Del total de muestras analizadas, el 71.5% (25 muestras) correspondía a muestras enviadas por los productores que respondieron las encuestas, mientras que 10 muestras fueron adquiridas a empresas que proveen alimentos balanceados para acuicultura en Argentina. Las muestras evaluadas correspondieron a Perú (3), Paraguay (1), Brasil (1), Colombia (2) y Argentina (28). El rotulo de los alimentos balanceados analizados, que indicaban en su composición la presencia de secuestrantes contra micotoxinas, correspondía al 14% (5 muestras). Del total de las muestras recibidas 28 correspondían a alimentos balanceados comerciales y 7 a alimentos balanceados producidos por los productores en forma artesanal.

La presencia de micotoxinas en los alimentos balanceados evaluados, indico, que el 27,6 % de las muestras comerciales medidas contenían niveles detectables de las micotoxinas analizadas (tricotecenos tipo B y aflatoxinas). Por otro lado, de los alimentos producidos por los productores, en el 66,7 % se le detectó al menos una micotoxina.

En particular, de los niveles detectados de AFB₁ el máximo fue de 320,0 µg kg⁻¹, mientras que el valor promedio entre las muestras positivas fue de 80,9 µg kg⁻¹, como se observa en la Tabla 1. 1.

TABLA 1.1. RELEVAMIENTO DE MICOTOXINAS EVALUADAS EN ALIMENTOS
BALANCEADOS DESTINADOS A ACUICULTURA.

Muestras Analizadas: 35		Periodo analizado: 2016-2021					
Micotoxinas	% Positivos	% Positivos Comerciales	% Positivos producción Artesanal	Concentración Máxima Hallada $\mu\text{g kg}^{-1}$	Promedio de Valores positivos $\mu\text{g kg}^{-1}$	LDA $\mu\text{g kg}^{-1}$	LQA $\mu\text{g kg}^{-1}$
AFB ₁	34,30	27,60	66,70	320,00	80,90	0,03	0,10
AFB ₂	28,60	24,10	50,00	78,50	27,00	0,03	0,10
AFG ₁	25,70	24,10	33,30	108,60	46,00	0,03	0,10
AFG ₂	25,70	24,10	33,30	64,20	23,00	0,03	0,10
AFM ₁	ND	ND	ND	ND	ND	3,00	10,00
DON	5,70	6,9	ND	202,20	161,90	1,00	5,00
NIV	ND	ND	ND	ND	ND	10,00	30,00
15-AcDON	ND	ND	ND	ND	ND	1,00	5,00
3-AcDON	ND	ND	ND	ND	ND	1,00	5,00

ND= No detectado. LDA: Limite detección analítico. LQA: Limite cuantificación analítico.
Muestras recolectadas en Argentina, Paraguay, Brasil, Colombia y Perú.

Discusión

Del análisis de las encuestas, al evaluar si la percepción de productor sobre la incidencia de las micotoxinas, y el impacto sobre su producción, la información recolectada reveló que existen grandes asimetrías entre los distintos establecimientos y en el conocimiento que los productores tienen sobre impacto de las micotoxinas en la acuicultura. Las complicaciones y problemáticas principales que los productores mencionan se centraron en un mismo eje, la calidad y trazabilidad de los insumos, la homogeneidad de los alimentos y la obtención de materias primas para elaboración de alimentos. Considerando que las recomendaciones de *Codex Alimentarius* (CODEX 2006, 2013), para la implementación de programas de monitoreo del nivel de contaminación de alimentos y piensos, así como de las indicaciones para evaluar los efectos obtenidos de las medidas adoptadas para reducir la contaminación en alimentos y piensos, todas se basan en reforzar la aplicación de buenas prácticas agrícolas (BPA), buenas prácticas de fabricación (BPF) y prácticas de almacenamiento (BPAL). La estandarización de lugares de almacenamiento, homogeneidad de materias primas y trazabilidad de los insumos son esenciales para la estimar en forma correcta los riesgos asociados y evaluar el impacto de las medidas adoptadas. (Gambaudo 2014)

Por su parte, la evaluación de los alimentos balanceados recolectados, entre 2016-2021, indicó que, entre otras micotoxinas, la aflatoxina de mayor incidencia fue AFB₁, lo cual es coincidente con la mayoría de los estudios reportados a nivel internacional (Medina et al. 2014, Mohamed et al. 2017). La incidencia total de AFB₁ fue del 27,6% en los alimentos comerciales y 66,7 % en los fabricados por los propios productores. Estos últimos valores son inferiores a los reportados en alimentos usados en Argentina para la cría de otros animales como el ganado vacuno, en los que se hallaron valores promedios de 67% de incidencia de AFB₁ en los concentrados de alimentos balanceados (Costamagna et al. 2019). Por otra parte, los valores encontrados coinciden con los valores reportados en

África y Brasil para alimentos destinados a la acuicultura. En éstos, se reportaron ocurrencias de AFB₁ del 64 % para África en los alimentos producidos en granjas, contra el 35,7 % para los alimentos comerciales. En Brasil el 55% de los alimentos para acuicultura analizados estuvieron contaminado con AFB₁ (Barbosa et al. 2013, Marijani et al. 2019).

Desconocemos de otros estudios que hayan medido la presencia de aflatoxinas en alimentos para acuicultura en Argentina, pero de la evaluación de las muestras recolectadas se detecta una alta incidencia, principalmente en los alimentos elaborados en forma artesanal.

El uso de secuestrantes para micotoxinas y la utilización de agentes antifúngicos en los alimentos comerciales analizados podría ser el motivo por el cual presentaron una menor incidencia de AFB₁. El análisis de los rótulos de los alimentos comerciales que no presentaron AFB₁ señalaban la presencia de agentes antifúngicos, secuestrantes contra micotoxinas, ácido propiónico, bentonita, levaduras y bacterias lácticas, todos ellos reconocidos productos antifúngico o utilizados como medidas de prevención a los efectos de las micotoxinas (Tapia Salazar et al. 2010, Centellegher 2019). Contrariamente, los alimentos analizados que presentaban AFB₁ no indicaban contener estos productos. Un caso similar se podría indicar para los establecimientos que producen su propio alimento. En las muestras de aquellos productores que indicaron usar secuestrantes no se detectó la presencia de aflatoxinas, lo que refuerza nuestra hipótesis.

Del análisis de las concentraciones encontradas, los valores máximos ($320,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) son inferiores a los reportados para la región en 2020 por BIOMIN ($2630 \mu\text{g kg}^{-1}$) (BIOMIN GmbH Erber Campus 1 3131 Getzersdorf, Austria). Sin embargo, los valores promedios de las muestras positivas ($80,9 \mu\text{g kg}^{-1}$) fue superior a los valores promedios de las muestras positivas para alimentos balanceados y comodites reportados en el mismo relevamiento ($7 \mu\text{g kg}^{-1}$). El porcentaje de incidencia para los alimentos comerciales es similar a los informados para los insumos para la región, lo que se explicaría por el hecho

que los mismos son preparados comerciales a partir de múltiples materias primas, disminuyendo así los valores máximos y manteniendo los promedios de incidencia. Se debe prestar atención a los niveles promedios encontrados ya que son 10 veces superiores a los promedios de los insumos utilizados. Considerando que las aflatoxinas pueden producirse en cualquier etapa de la cadena de producción de alimentos balanceados, como así también en el almacenado, sería recomendable un análisis particular de los insumos y los procesos. La heterogeneidad en el suministro de materias primas sea en calidad o variedad, es otro factor por considerar como relevante para el progreso del sector. Se sabe que la contaminación en los diferentes ingredientes de un alimento difiere ampliamente según la zona geográfica, variando el tipo de micotoxinas, el nivel de contaminación y los procesos tecnológicos utilizado. La aplicación de distintos tipos de limpieza y clasificación de granos y semillas reduce los niveles de micotoxinas. Por ejemplo, el fresado en seco reduce el nivel de aflatoxinas del trigo mientras que la molienda húmeda genera un proceso de concentración de la AFB₁ en el germen y el gluten que permite obtener almidón sustancialmente libre de aflatoxinas.(Cheli et al. 2017, Pietsch 2020)

Conclusiones parciales

En el presente capítulo se encuestó a los productores con el objeto de evaluar el grado de conocimiento y condiciones productivas de los establecimientos de acuicultura de Pacú y se evaluó la incidencia de micotoxinas en alimentos balanceados de la región dedicado a tal fin. Las principales conclusiones alcanzadas son:

- En general, el productor desconoce la problemática de las micotoxinas y los posibles efectos negativos que pueden tener un evento de aflatoxicosis sobre la producción acuícola.
- Las frecuencias de detección de micotoxinas encontradas en los alimentos balanceados concuerdan con los valores reportados para la región y que aquellos alimentos que indicaban productos para mitigar el efecto o aparición de micotoxinas no presentaron valores detectables.
- Las concentraciones promedios de aflatoxinas en los alimentos balanceados en los que se detectó la micotoxina fueron 10 veces superiores a los promedios reportados para los insumos utilizados en la producción de alimentos balanceados en la región, sugiriendo que las mismas se producirán durante el proceso de producción, almacenado o distribución.

CAPÍTULO 2:

**Toxico cinética: estudio de la bioacumulación y
eliminación de la AFB₁ en función del tiempo**

Introducción

Aflatoxinas, evaluación de riesgo para el consumidor, límites máximos

Faulkner (2014) remarca que, de todas las micotoxinas reguladas en alimentos, la AFB₁ es la más regulada a nivel mundial. Sin embargo, la normativa varía entre los distintos países siendo importante una armonización para eliminar la variabilidad e incluir los alimentos que no están contemplados y poder evaluar los riesgos asociados al consumo de aflatoxinas.

La recopilación de datos con fines de evaluación de riesgos se basa en la implementación de distintas estrategias. Una de ellas consiste en recopilar datos de ocurrencia en los programas de vigilancia de alimentos de rutina realizados a nivel de un país específico con el fin de verificar programas de monitoreo y determinar los niveles de sustancias químicas en los alimentos comúnmente consumidos por la población. Este enfoque ha sido fomentado recientemente por OMS, la FAO y la EFSA (Ingenbleek et al. 2020).

Los programas de seguimiento y evaluación del *Codex Alimentarius*, por ejemplo, evalúan el nivel de contaminación de alimentos y piensos, así como el efecto obtenido con las medidas adoptadas para reducir la contaminación. A su vez, para aquellos estudios en los cuales exista evidencia que indique que el consumo de alimentos contaminados puede entrañar un peligro para la salud, se realizan evaluaciones del peligro mediante comités de expertos (EFSA 2007, CODEX 2013).

Debido a que se han detectado residuos de AFB₁ en el músculo de la mayoría de las especies de peces estudiadas, varios autores indican que aquellas destinadas a consumo humano deberían ser contempladas en los estudios de riesgos de los consumidores (Santos et al. 2015, Bedoya-Serna et al. 2018).

Los estudios más recientes sobre incidencia de aflatoxinas publicados por Organización Mundial de la Salud (JECFA 2017), se basaron en datos de Argentina, Brasil,

China, Egipto, Francia, Grecia, Irlanda, República Islámica de Irán, Japón, Kenia, Líbano, Malasia, México, Marruecos, Holanda, Nueva Zelanda, Pakistán, Portugal, República de Corea, Serbia, España, Sri Lanka, Túnez, Turquía y la República Unida de Tanzania. Si bien concluyeron que los resultados variaban de acuerdo con los alimentos incluidos, los mismos indicaron que la exposición dietética en los países desarrollados suele ser inferior a $0,1 \text{ ng kg}^{-1}$ de peso corporal por día, mientras que en los países en vías de desarrollo puede llegar a 49 ng kg^{-1} de peso corporal al día, y en los países del África subsahariana se registraron valores de 400 ng kg^{-1} de peso corporal al día.

Actualmente la OMS, no ha establecido recomendaciones de límites de ingesta máximos diarios (TDI) para aflatoxinas, aunque en su último reporte sobre el tema, de 2016, señala que la reducción de la exposición alimentaria a las aflatoxinas es un objetivo importante de salud pública. Por su parte Kuiper-Goodman (1995), basándose en los datos epidemiológicos obtenidos en algunos países asiáticos y africanos, indican que la TDI estimada para la AFB₁ oscilaría entre $0,11$ a $0,19 \text{ ng kg}^{-1}$ de peso corporal al día. Se debe tener en cuenta que estos cálculos fueron realizados en regiones donde la población está expuesta a Hepatitis B (HBV) endémica, por lo que los propios autores del estudio indican que en caso de en ausencia de una infección endémica por HBV este rango probablemente sería de un orden de magnitud mayor. Por su parte, Nielsen (2017) indica que los compuestos genotóxicos como las aflatoxinas tienen una probabilidad de inducir un efecto a cualquier dosis, por lo tanto, no debe considerarse ninguna dosis umbral y no deberían estar presentes en los alimentos.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas estimaciones y recomendaciones, pueden no representar la exposición real de estas poblaciones, las cuales fueron realizadas en base a datos que contemplan muy pocos alimentos en los cuales generalmente es detectada la presencia de aflatoxinas (cereales, maní, pistacho) y no se incluyen alimentos

para los cuales se han reportado frecuentemente residuos de aflatoxinas como, por ejemplo, la carne de pescado (Bedoya-Serna et al. 2018, Oliveira and Vasconcelos 2020).

Recientemente varios autores (Valladão et al. 2018, Irwin et al. 2020), resaltan que se ha se ha podido observar un incremento en el consumo de pescados por parte de los productores acuícolas y sus familiares, resaltando la importancia que tiene la acuicultura para la dieta de las poblaciones en países en vías de desarrollo. En el caso particular de Latinoamérica, la producción de peces nativos está superando actualmente a la producción de especies exóticas en varios países. Lo que ha aumentado la demanda y el consumo de estas especies debido a la facilidad de acceso, políticas de turismo rural, y la reivindicación de saberes locales (Carciofi and Rossi 2021).

En el caso particular del Pacú, los estudios realizados con la especie y el consumo de aflatoxina están dirigidos a conocer efectos sobre parámetros productivos, pero se desconoce si hay acumulación de residuos de aflatoxinas y cuáles serían los valores máximos de acumulación en musculo.

Considerando que algunos de los insumos utilizados en la preparación de alimentos balanceados destinados a la acuicultura en nuestro país han presentado con frecuencia concentraciones detectables de aflatoxinas (Camiletti et al. 2017), es de relevancia estimar el máximo nivel de acumulación de AFB₁ en los tejidos comestibles en la especie.

Estudios de bioacumulación de aflatoxinas en peces

Bedoya-Serna et al. (2018) indican que existe una carencia de estudios que correlacionen los niveles de AFB₁ en la dieta con los niveles registrado en el tejido de pescado destinado al consumo humano y que esta información es esencial para la protección de la salud pública. Los estudios disponibles en la literatura que evalúan la acumulación de residuos de aflatoxinas en peces utilizan, por lo general, dietas con

elevadas concentraciones de aflatoxinas. Sin embargo, los efectos de las dietas contaminadas con aflatoxinas a los niveles permitidos o concentraciones que se detectan habitualmente en los alimentos balanceados en los sistemas de producción acuícola no están claros o fueron poco estudiados. Nomura et al. (2011) consideran, luego de un relevamiento bibliográfico, que no se han determinado con suficiente detalle las características de la absorción oral y la eliminación de las aflatoxinas en peces.

En los trabajos disponibles, se ha comprobado que existe bioacumulación de aflatoxinas en diferentes especies de peces, habiéndose detectado residuos de AFB₁ y sus metabolitos en tejidos de Carpa Gabel (*Carassius auratus gibelio*) (Bedoya-Serna et al. 2018), Bagre de Canal (*Ictalurus punctatus*) (Jantrarotai et al. 1990), Lambari (*Astyanax altiparanae*) (Michelin et al. 2017), Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Deng et al. 2010) y Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Nomura et al. 2011), entre otros. Aunque generalmente las concentraciones encontradas en los tejidos suelen ser relativamente bajas en comparación a los límites máximos aceptados para otros alimentos, las concentraciones detectadas varían ampliamente según la especie estudiada. Las conclusiones de la mayoría de los trabajos indican que la AFB₁ tiene una baja capacidad de bioacumulación (Santacroce et al. 2007, Oliveira and Vasconcelos 2020)

Metabolismos de aflatoxinas en peces

El destino de la AFB₁ difiere en los humanos y otros animales en función de las relaciones entre las distintas isoformas del Citocromo P₄₅₀ (CYP₄₅₀). La O-dealquilación, la cetorreducción, la epoxidación y la hidroxilación son las principales vías metabólicas de la AFB₁ en el hígado a través del sistema de biotransformación de fase I, principalmente por las isoenzimas CYP_{1A2} y CYP_{3A4} (Thiendedsakul et al. 2020). Estas reacciones conducen a la síntesis de formas altamente tóxicas de AFBO y AFM₁ o relativamente no tóxicas como la aflatoxina P₁ (AFP₁), AFQ₁ o la aflatoxina 2a (AFB_{2a}) (Dohnal et al. 2014,

Thiendedsakul et al. 2020). El metabolito AFBO tiene la capacidad de formar aductos con los nucleótidos del ADN, los cuales no pueden ser reconocidos por los mecanismos de reparación del ADN, provocando mutación de genes y, por lo tanto, el desarrollo de carcinomas hepatocelulares. En las reacciones de biotransformación de fase II, la enzima glutatión-s-transferasa (GST) cataliza la conjugación del metabolito AFBO con el glutatión para facilitar su eliminación del cuerpo (Yang et al. 2000, Ziglari and Allameh 2013, Dohnal et al. 2014).

Modelos toxicocinéticos (MTC)

El principal propósito de los modelos toxicocinéticos es el de proporcionar datos que permitan la comparación directa con la exposición humana o animal al compuesto de prueba de acuerdo con los diferentes niveles de dosis empleados durante los estudios de toxicidad. El diseño de modelos toxicocinéticos (MTC) involucran los procesos que ocurren en las etapas absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME), y son necesarios para estimar los datos toxicocinéticos que sirven como base para una mejor evaluación de la seguridad alimentaria (Chasseaud 1992). Los enfoques más simples para tomar en cuenta los MTC se basan en hipótesis de estado estacionario que reflejan el equilibrio entre la acumulación de un compuesto y su eliminación de todas las vías de exposición. Es decir, tanto la exposición como los factores ambientales y fisiológicos que afectan a la absorción y eliminación de la sustancia química permanecen constantes. Los modelos compartimentales describen movimientos de los tóxicos entre compartimentos que pueden o no tener un significado fisiológico o anatómico. El tóxico entra en un compartimento según un coeficiente de tasa de absorción y sale según un coeficiente de tasa de eliminación (Gibaldi and Perrier 1982, Newman 2015). La elección de la estructura del modelo suele depender de la disponibilidad de datos experimentales en uno o varios tejidos o fluidos y también de la adecuación del modelo a estos datos experimentales

(Grech et al. 2017). Los MTC fueron aplicados a una extensa variedad de productos químicos, entre los que se incluyen metales, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados (PCB), ésteres de organofosforados (OP) y micotoxinas. Entre las principales ventajas del uso de MTC podemos destacar que permite extrapolar y estimar parámetros como concentración máximas, tasa de absorción, la tasa de eliminación, la vida media en el organismo y el factor de bioacumulación del tóxico (Newman 2015).

Pacú

El Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) (Figura 2. 1 y 2. 2), es una especie autóctona legalmente aceptada en todo el territorio para su consumo, muy demandada en las regiones turísticas del norte del país, y que desde el 2016 se exporta Brasil y Bolivia. Además, esta especie representó el mayor volumen de producción de la acuicultura en Argentina desde el año 2011 hasta el 2019 y actualmente representa la segunda en producción luego de la Trucha Arco Iris (MAGyP 2019).



Estanques de experimentación ITA -INTA Buenos Aires, Argentina

FIGURA 2.1. JUVENIL DE PACÚ.



*AER Apóstoles INTA Misiones Argentina.
Foto: cortesía Ing. Agr. Sendlak Marcelo*

FIGURA 2.2. RECOLECCIÓN DE CULTIVOS DE PACÚ.

No existe información en los organismos oficiales, sobre datos actualizados y respaldados del consumo de la especie en la Argentina, aunque según los valores de producción y exportación, se estima que el 90% se consume dentro del territorio nacional.

No se han hallado trabajos publicados sobre sobre la toxicocinética ni la biotransformación de las aflatoxinas en esta especie.

En función de lo expuesto previamente, se plantean las siguientes hipótesis de estudio.

Hipótesis específicas

- *La cinética de acumulación y las concentraciones de AFB₁ en músculo e hígado del Pacú, dependen de la concentración de la toxina en el alimento y del tiempo de exposición, y puede ser representado mediante un modelo toxicocinético general de un compartimiento.*
- *AFB₁ es metabolizada y eliminada rápidamente de dichos tejidos, cuando los peces dejan de ser alimentados con la toxina.*
- *Por su carácter hidrofílico y sus vías de metabolización, los niveles máximos de acumulación de la toxina son bajos y no superan los límites establecidos para otros alimentos.*

Objetivos Particulares

- *Estudiar la cinética de bioacumulación de la AFB₁ y su metabolito AFM₁ en músculo e hígado de Pacú, expuesto crónicamente por vía de la alimentación a concentraciones subletales de AFB₁.*
- *Estimar tiempo de detoxificación de AFB₁ y AFM₁ en músculo e hígado de Pacú*
- *Modelizar la cinética de bioacumulación, estimando las constantes de absorción y eliminación los factores de bioacumulación, y el tiempo de eliminación de la toxina en los tejidos estudiados.*

Materiales y métodos

Estrategia experimental

Para evaluar la bioacumulación y la eliminación de AFB₁ en el músculo de Pacú en función de la concentración de la toxina en el alimento y el tiempo de exposición, se expusieron durante 47 días juveniles de Pacú a dietas suplementadas con cuatro niveles de AF₁ (0, 1, 100 y 1000 µg kg⁻¹). El tiempo de exposición se estableció en función de estudios similares realizados con otras especies (Nomura et al. 2011), y de acuerdo a la cinética de acumulación obtenida en los ensayos preliminares (Anexo: Ensayos complementarios) en las que se observó cubren un periodo de tiempo suficiente para alcanzar un nivel máximo de acumulación (plateau). El ensayo se dividió en dos etapas: i) un período de acumulación, en el cual durante 47 días se suministró alimentó con las 4 concentraciones detalladas de ABF₁ y ii) un período de depuración, en el cual se ofreció alimentos libre de AFB₁ a todos los grupos durante otras 72 h. Las concentraciones de residuos de AFB₁ y AFM₁ en hígado y músculo de los peces se midieron a los tiempos de 0, 3, 7, 14, 22, 29, 37, 44 y 47 días del período de acumulación y a las 24, 48 y 72 h del período de depuración.

Las concentraciones utilizadas en las dietas se establecieron de acuerdo con datos bibliográficos (Santacroce et al. 2007, Deng et al. 2010, Nomura et al. 2011, Zychowski et al. 2013, Wang 2016, Jalilpour et al. 2018), el relevamiento de concentraciones en los alimentos balanceados de la región (Capítulo 1) y ensayos preliminares para determinar que las concentraciones utilizadas no causarían efectos letales en ninguno de los tratamientos.

Para el diseño se siguieron las recomendaciones y pautas de las guías serie 870 para pruebas de pesticidas y sustancias tóxicas de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, adaptadas a los objetivos y requisitos de especies del presente estudio (EPA 2009).

Preparación de alimentos con adición de aflatoxina B₁ (AFB₁)

Para la preparación del alimento con adición de AFB₁ para todos los ensayos de la tesis se utilizó AFB₁ obtenida de *Aspergillus flavus* Sigma >98% de pureza. Veinticinco miligramos del estándar fueron disueltos en 25 ml de solución etanol: agua (8:2), obteniendo una solución de 1000 µg ml⁻¹ de AFB₁ ("SnConcAFB₁"). A partir de esta solución concentrada de AFB₁ se prepararon 3 soluciones para la incorporación de AFB₁ al alimento y se reservó el resto de la solución para la preparación de la concentración más alta de alimento como se muestra en la Tabla 2.1. Las soluciones fueron rotuladas como: Si-B, Si-M y Si-A las respectivas concentraciones de aflatoxinas para estas soluciones de 0,5 µg ml⁻¹, 50 µg ml⁻¹ y 500 µg ml⁻¹.

TABLA 2.1: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES AFB₁

Solución de dopado	SnConcAFB ₁ Volumen (µl)	Volumen final (ml) (Sn etanol: agua 8:2)	Conc. AFB ₁ (µg ml ⁻¹)
Si-B	5	10	0,5
Si-M	500	10	50,0
Si-A	12500	25	500,0
SnConcAFB ₁	11995	0	1000,0

SnConcAFB₁. 1 mg ml⁻¹

La preparación de las raciones de alimento con AFB₁ se realizó pulverizando en forma homogénea sobre 500 g de alimento paletizados, soluciones de dopado disueltas en etanol agua 8:2 con agitación continua, mediante un agitador orbital, dentro de una cabina de seguridad de bioseguridad Clase II tipo A2, Tabla 2. 2. Con el fin remover toda la AFB₁ de los pulverizadores, se realizó una segunda aplicación con 5 ml de solución de etanol agua 8:2. Para la preparación de la ración "R-100000", se utilizaron 100 gramos de alimento. Los alimentos fueron llevados a estufa a 35°C durante 72 h evaporando de esta forma el solvente aplicado. Luego se fracciono y guardo en bolsas herméticas.

El alimento utilizado fue el mismo utilizado en la etapa de aclimatación, este fue previamente analizado para determinar la ausencia de AFB₁ (LQA Anexo Tabla 1. 1)

La concentración real de AFB₁ fue evaluada, como se indicó en Capítulo 1, en las raciones con tratamiento y la ración control.

TABLA 2.2: PREPARACIÓN DE ALIMENTOS CON AFB₁

Ración de alimento ¹	Solución incorporación	Volumen (ml)	Etanol/agua (8:2) Volumen (ml)	Conc. nominal AFB ₁ (µg Kg ⁻¹)
R-0 (500gr)	Si-0	0	50	0
R-1 (500gr)	Si-B	1	49	1
R-100 (500gr)	Si-M	1	49	100
R-1000 (500gr)	Si-A	1	49	1000
R-10000 (500gr)	Si-A	10	40	10000
R-100000 (100gr)	SnConcAFB ₁	10	0	100000

¹ Ración de alimento: Identificación utilizada en los ensayos, entre paréntesis masa de alimento preparado.

Estabilidad del alimento balanceado en agua (WSI)

Para medir la estabilidad del alimento balanceado en agua, WSI, por sus siglas en inglés Water Solubility Index. Una fracción de cada uno de los alimentos con AFB₁ (Tabla 2.2.) se tomó para realizar un pool, el cual fue sometido a una prueba de estabilidad estática en agua. La metodología utilizada consistió en una adaptación de la descrita por (Fagbenro and Jauncey 1995). Para el ensayo, 10 g de alimento se colocaron en una probeta de 250 ml, la cual contenía 200 ml de agua destilada a 25°C. Después de una hora de inmersión, sin agitación, el contenido de la probeta se filtró con la ayuda de una bomba de vacío a través de un papel filtro Whatman No. 1 (Whatman; Maidstone, Kent, UK), previamente secado y pesado. El papel filtro con el alimento residual se sometió a un secado en una estufa a 105°C por 2 horas. La estabilidad del alimento en agua se calculó como la diferencia porcentual de peso antes y después del ensayo, expresada como porcentaje de pérdida de materia seca. La prueba fue realizada por triplicado.

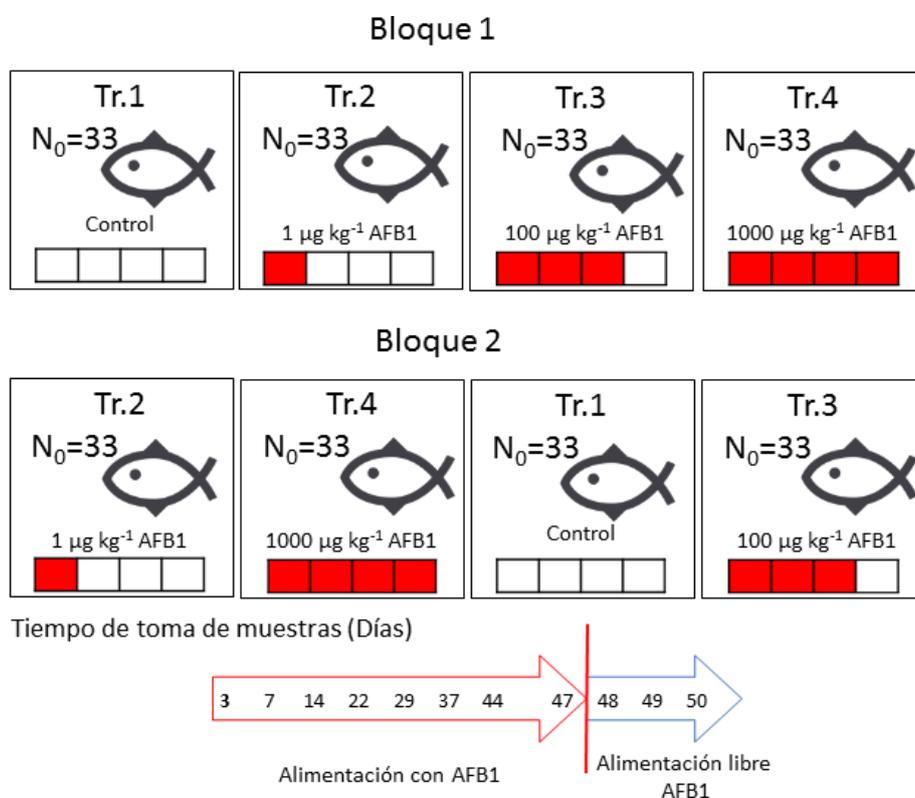
$$\text{WSI (\%)} = 100 \times \frac{\text{Peso Alimento Seco}_{(\text{Inicial})} - \text{Peso Alimento Seco}_{(\text{final})}}{\text{Peso Alimento Seco}_{(\text{inicial})}} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

Descripción de los ensayos

Ensayo 1: Acumulación de residuos de aflatoxinas en tejidos. Un total de 264 juveniles de Pacú con un peso promedio de $13,9 \pm 4,1$ g gramos se dividieron aleatoriamente en 2 grupos (bloques) formados por cuatro peceras de vidrio con 33 individuos cada una. El ensayo fue realizado en las instalaciones del ITA-CIA-INTA, las peceras presentaron iguales condiciones de capacidad, aireación, fotoperiodo y temperatura controlada. La concentración de oxígeno disuelto > 5 mg/L y el pH del agua entre 7.0 y 7.5. La luz suministrada al cuarto fue controlada mediante un PLC, ofreciendo un fotoperiodo de 16 h de luz: 8 h de oscuridad, mientras que la temperatura se mantuvo a 25 ± 3 °C. Todos los peces fueron alimentados dos veces al día durante 47 días a una tasa del 3% de biomasa de cada pecera con diferentes concentraciones de aflatoxina a través del alimento. La dosis de alimento suministrado se ajustó semanalmente, en función de la biomasa total para mantener el porcentaje constante.

El tratamiento 1 (EiTr.1) fue alimentado una ración libre de AFB₁ (R-0). El tratamiento 2 (EiTr.2) fue alimentado con una ración que contenía AFB₁ en dosis de $1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (R-1), el tratamiento 3 (EiTr.3) fue alimentado con una ración que contenía AFB₁ en dosis de $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (R-100) y el tratamiento 4 (EiTr.4) fue alimentado con una ración que contenía AFB₁ en dosis de $1000 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (R-1000). Todos los grupos recibieron los cuatro tratamientos y el orden de las peceras dentro de los grupos fue aleatorio. Las condiciones de mantenimiento y control diario de las peceras incluyeron el registro de temperaturas, oxígeno disuelto, pH y tasa de renovación de agua del 30%. En cada tiempo de ensayo se sacrificaron 3 peces de cada pecera y se tomaron muestras de hígado y músculo para las

determinaciones cuantitativas de AFB₁. Los tiempos de análisis y el diseño experimental se puede observar en el Figura 2. 3.



Peces Muestreados
3 x tratamiento x día = Total 264

Tr= tratamiento. N₀ = peces al comienzo del ensayo en cada pecera. AFB₁= Aflatoxina B₁

FIGURA 2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA TOXICOCINÉTICA DE AFB₁ EN PACÚ.

Obtención de los organismos y aclimatación

Los peces utilizados para los Ensayos fueron juveniles de Pacú donados por Teko Pacú (Av. Italia 215, Resistencia, Chaco Argentina) y adquiridos en el establecimiento productivo Pez Campero-Complejo Ictícola (Paraná - Entre Ríos - Argentina). Los peces llegaron al laboratorio con un tamaño de $2,86 \pm 0,47$ cm y un peso de $1,07 \pm 0,57$ g con un tiempo de vida de 20 días.

Los alevines fueron criados y aclimatados en el laboratorio del área de protección de alimentos del Instituto de Tecnología de Alimentos, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (ITA-CIA-INTA). El estanque de aclimatación tuvo una capacidad de 2500 litros y la temperatura se mantuvo a 25 ± 3 °C, la concentración de oxígeno disuelto > 5 mg/L y el pH del agua entre 7.0 y 7.5. La luz suministrada al cuarto fue controlada mediante un PLC, ofreciendo un fotoperiodo de 16 h de luz: 8 h de oscuridad. Los organismos fueron alimentados con el pellet comercial “AWAMIX 05 - Alimento balanceado para peces Omnívoros y Herbívoros” (Mixes del Sur SRL) ocho veces al día mediante alimentadores automáticos. La composición aproximada (humedad, proteína bruta (PB), extracto éter (EE), fibra bruta (Fibra), minerales totales, calcio, fósforo, antioxidantes y vitaminas) se indica en Tabla 2.3.

TABLA 2.3. COMPOSICIÓN CENTESIMAL DEL ALIMENTO BALANCEADO INFORMADA POR EL FABRICANTE

AWAMIX 05 - Alimento balanceado para peces omnívoros y herbívoros
(2,65 Kcal de energía digestible/g)

Análisis nutricional		
Proteína Cruda (PB)		>27 %
Humedad		<13 %
Extracto de éter (EE)		>1 %
Fibra bruta (Fibra)		<7.5 %
Minerales totales		<10%
Calcio		>0,1% <2%
Fósforo		>0,3% <1.2%
Antioxidantes		<0,05%
Vitaminas	Vitamina A (Retinol)	2000 UI
	Vitamina D ₃ (Calcitriol)	1000 UI
	Vitamina E (Tocoferol),	50 UI
	Vitamina C (Ascórbico)	100 UI

Lista de ingredientes: DDGS (Subproductos de la destilación de alcohol de granos de cereal), Harina de Soja, Trigo, Harina de Trigo, Afrecho de Trigo, Maíz, Arroz, Pellet de Girasol, Harina de Gluten de Maíz, Soja Desactivada, Pellet de maní. Hierro, Zinc, Manganeso, Cobre, Cobalto, Yodo, Selenio, Magnesio, Vitamina A (Retinol), Vitamina D₃ (Calcitriol), Vitamina E (Tocoferol), Vitamina K₃ (Menadiona), Vitamina C (Ascórbico), Pantotenato de Ca, Vitamina B₁ (Tiamina), Vitamina B₂ (Riboflavina), Vitamina B₃ (Niacina), Vitamina B₆ (Piridoxina), Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina), Ácido fólico, Biotina, Cloruro de colina, Metionina 98%, Antioxidante BHT (Butil Hidroxitolueno), Levadura de cerveza prensada (Saccharomyces cerevisiae), Excipientes (Semitina), Conchilla molida, Sal, Fosfato bicálcico.

El periodo de aclimatación fue de aproximadamente 2 meses hasta llegar a tamaño promedio de 12 gramos y el estadio de juvenil.

Muestreo de los peces

Los peces fueron retirados de las peceras con redes rectangulares para acuario N° 8 de 20 cm de largo por 18cm de ancho y fueron colocados inmediatamente en vasos de precipitado de 2 litros que contenía agua con hielo con el fin de anestesiarlos. Se registró la longitud estándar y peso corporal. Inmediatamente después se tomó una muestra de sangre de la vena caudal con una jeringa heparinizada.

Se sacrificaron los peces, cortando el cordón neural detrás del cerebro y se retiraron ambos arcos branquiales. Se hizo un corte longitudinal en el abdomen y se extirpó el hígado. Finalmente, se tomó una muestra de músculo dorsal a ambos lados del pez. Las muestras de tejido se almacenaron a -80 °C hasta que se realizaron los análisis correspondientes. Todos los procedimientos en los que participaron peces vivos se realizaron de acuerdo con las directrices de referencia sobre: el cuidado y el uso de los peces en la investigación, la enseñanza y ensayos del Consejo Canadiense para el Cuidado de los Animales (CCAC 2005). Además, todas las manipulaciones de animales se realizaron con la aprobación de un comité local de ética institucional para el cuidado y el uso de animales de laboratorio (Protocolo CICUAL 006-26-17, Universidad Nacional de La Plata).

Análisis de la acumulación de aflatoxinas en tejidos

Una porción de las muestras de los tejidos disectados en el Ensayo 1 se purificaron y concentrados mediante métodos desarrollados previamente en el laboratorio para la detección de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ y AFM₁) en tejidos. Para la detección de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ y AFM₁ en tejidos, se pesaron 0,5 g de hígado o 2,0 g de músculo y se extrajeron con 10 ml de solvente (acetonitrilo/agua/ácido acético 79+20+1). Se realizó un “Salting-out” con 1 g de NaCl. Las muestras fueron homogenizadas por molino estilo ultraturrax y luego sonicadas por 60 minuto para favorecer la extracción. Luego se

centrifugó la muestra durante 5 minutos a 3000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se lo evaporó con N₂. Seguido, se resuspendió en 1 ml de acetonitrilo agua (30:70). Luego, se lo diluyó con 9 ml de agua ultrapura y se purificó con un cartucho SPE C₁₈ (Strata C₁₈-E 55um 70 A 100mg Phenomenex). Se lavó el cartucho con 2 ml de metanol:agua (1:99). La muestra fue eluida en 200 µl de metanol/agua (80/20) y filtrada con membrana de nylon de 0,22 µm antes de su análisis cromatográfico.

La acumulación de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ y AFM₁ se analizaron por HPLC-FLD (Waters Alliance 2695, detector de fluorescencia Waters 996) con derivatización postcolumna con una celda Kobra-Cell (R-Biopharm). La confirmación de las muestras positivas se realizó por HPLC-MS/MS (Thermo LTQ XL) en modo de ionización ESI positivo y modalidad de escaneo MRM. Las condiciones cromatográficas y la configuración del espectrómetro de masas coinciden con las detalladas en el Capítulo 1 para el análisis de aflatoxinas en los alimentos balanceados.

En músculo, la recuperación media de los niveles de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ y AFM₁ fue de 88,2, 92,3, 85,1, 91,8 y 78,2 %, respectivamente. El límite de detección analítico de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en el músculo fue de 0,004 µg kg⁻¹ y el límite de cuantificación analítico fue de 0,01 µg kg⁻¹. Para AFM₁, el límite de detección analítico en el músculo fue de 0,008 µg kg⁻¹ y el límite de cuantificación analítico fue de 0,02 µg kg⁻¹.

En hígado, la recuperación media de los niveles de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ y AFM₁ fue de 99,0, 81,2, 97,8, 80,4 y 75,5 %, respectivamente. El límite de detección analítico de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en el hígado fue de 0,01 µg kg⁻¹ y el límite de cuantificación analítico fue de 0,05 µg kg⁻¹. Para AFM₁, el límite de detección analítico en el hígado fue 0,05 µg kg⁻¹ y el límite de cuantificación analítico fue de 0,15 µg kg⁻¹.

Las recuperaciones en los tejidos fueron calculadas sobre muestras blancos, a las cuales se le sobreagregó AFB₁ y fueron contrastadas contra curva de calibración con

matriz. Las concentraciones de evaluación en las muestras sobreagregadas fueron de dos veces el límite de cuantificación analítico y se realizaron por duplicado, en cada ensayo.

Modelo MTC

Los resultados de las fases de acumulación y de eliminación de aflatoxinas obtenidos en el Ensayo 1, se modelaron utilizando un modelo toxicocinético de primer orden de un solo compartimento (MTC) (Newman 2015, Grech et al. 2017, Hou et al. 2019). El modelo se utilizó para estimar las constantes de las tasas de absorción (K_u) y de eliminación en la fase de exposición (K_e), el tiempo de retardo (t_{lag}) y el factor de bioacumulación (BAF). La tasa de eliminación (K_e) se modeló utilizando la Ecuación 2.2 durante el período de depuración (días 47 a 50). La tasa de eliminación en la fase de exposición (K_e) y la tasa de absorción (K_u) se estimaron a partir de la Ecuación 2.3 durante el período de exposición a la micotoxina (días 1 a 47).

$$C_{(t)} = C_0 \times e^{-k_e t} \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

$$C_{(t)} = \frac{K_u}{K_e} \times C_f \left[1 - e^{-K_e(t-t_{lag})} \right] \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

C(t): Concentración de AF en el músculo o el hígado de los peces en el momento t (días) del experimento de eliminación,

C0: Concentración de AF en los peces (músculo o hígado) al comienzo del experimento de eliminación,

Cf: Concentración de Aflatoxina en la alimentación.

t: período del experimento en días.

La vida media de eliminación $t_{(1/2)}$ se calculó mediante la Ecuación 2.4, el Factor de Bioacumulación (BAF) se estimó a partir de la Ecuación 2.5 y la Concentración a Tiempo Infinito (CT_{∞}) mediante la Ecuación 2.6 (Newman 2015).

$$t_{(1/2)} = \frac{\ln 2}{K_e} \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

$$\text{BAF} = \frac{K_u}{K_e} \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

$$CT_{\infty} = \frac{K_u}{K_e} C_f \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

Cf: Concentración de Aflatoxina en la alimentación.

Resultados

Propiedades del alimento balanceado

La estabilidad promedio de los alimentos en agua expresada como pérdida porcentual de materia seca (WSI %) fue $16,98 \pm 0,14$ %, los valores obtenidos se presentan en Tabla 2. 4.

En particular, los valores registrados, cumplen con los parámetros aceptables (< 30%).

TABLA 2.4. MEDICIONES DE ESTABILIDAD EN AGUA, DE LOS ALIMENTOS PREPARADOS CON AGREGADO DE AFB₁, EXPRESADA COMO PÉRDIDA PORCENTUAL DE MATERIA SECA (WSI %).

Peso alimento seco final (g)	Peso alimento seco inicial (g)	WSI %
8,3212	9,9813	16,83
8,2961	9,9952	17,00
8,2815	9,9912	17,11

La AFB₁ no fue detectada en el alimento control. Las concentraciones medidas para las raciones con la adición de AFB₁ (R₁, R₁₀₀, R₁₀₀₀, R₁₀₀₀₀ y R₁₀₀₀₀₀) se asemejaron a las concentraciones nominales. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 2. 5.

TABLA 2.5. CONCENTRACIÓN MEDIDAS DE AFLATOXINA B₁ (AFB₁), EN ALIMENTOS ADICIONADOS CON AFB₁ USADOS EN ENSAYOS 1,2 Y 3.

Ración de alimento	Nominal	Evaluada replica A	Evaluada replica B	Promedio	CV%
		Concentración AFB ₁ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
R-1	1	1,09	1,00	1,05	3,11
R-100	100	98,30	97,80	98,05	1,39
R-1000	1000	1027,15	1032,22	1029,69	2,07
R-10000	10000	10050,50	10041,70	10046,10	0,33
R-100000	100000	99980,80	99970,27	99975,54	0,02

CV: Coeficiente de variación porcentual

Acumulación de residuos de AFB₁ en músculo e hígado

Los análisis de residuos de aflatoxinas en músculo e hígado detectaron presencia de AFB₁ y AFM₁. Otros metabolitos, como AFB₂, AFG₁ y AFG₂ no fueron detectados en la musculatura evaluada. Las concentraciones promedio de residuos de AFB₁ Y AFM₁ halladas en músculos e hígados de los peces expuestos a las diferentes concentraciones de AFB₁ en el alimento y a los distintos tiempos de exposición del Ensayos 1, junto a sus coeficientes de variación, se presentan en las Tablas 2. 6; 2. 7; 2. 8 y 2. 9. Tanto en el hígado como en el músculo, la acumulación de la toxina y su metabolito guardó relación con la concentración de exposición. Respecto a la acumulación en función del tiempo, la respuesta fue diferente en cada tejido. Mientras que en el músculo la toxina y su metabolito se acumularon de forma creciente hasta alcanzar un nivel de saturación, en el hígado presenta un comportamiento atípico. La máxima concentración de AFB₁ y AFM₁, se presentó a 14 y 22 días, respectivamente, luego las concentraciones descendieron y estabilizaron a niveles de acumulación aproximadamente 10 veces por debajo de ese valor máximo.

En particular, en las concentraciones de exposición más elevadas, se detectó a partir del día 22 de exposición, que la concentración de AFB₁ en el hígado descendió abruptamente, presentado un descenso del 60 % en los animales expuestos a 100 µg kg⁻¹ y del 84% para los expuestos a 1000 µg Kg⁻¹. Este quiebre en la tendencia coincidió con las primeras detecciones de la AFM₁ en hígado. Posteriormente, se observó un descenso del 60% en ambos tratamientos en el día 29, a partir del día 37 se observaron valores estables cercanos al 50% del correspondiente al día 29. Obteniendo a partir de este tiempo de exposición valores similares en todos los tratamientos con AFB₁, en un rango comprendido entre 1,4 y 2,0 µg Kg⁻¹.

En cuanto a las concentraciones máximas, los niveles de acumulación de la toxina y su metabolito fueron 180 y 664 veces mayores en el hígado que en el músculo, respectivamente.

Por otra parte, la AFB₁ se detectó más tempranamente en el hígado (día 3 en todos los tratamientos) que en el músculo (día 7 para las dos concentraciones más altas). Contrariamente, AFM₁ fue detectada antes en el músculo (día 7 en la concentración más alta) que en el hígado (día 22 para las dos concentraciones más altas). En particular se observó que a mayor concentración de exposición a AFB₁, se requiere menor tiempo de exposición para detectar los residuos de AFB₁ y sus metabolitos.

TABLA 2.6. CONCENTRACIONES DE AFB₁ MEDIDA EN EL MÚSCULO DE LOS PACÚES EXPUESTOS A TRAVÉS DEL ALIMENTO EN EL ENSAYO 1

Concentración AFB ₁ en alimento (µg kg ⁻¹)	Concentración promedio de AFB ₁ en músculo (µg kg ⁻¹)							
	Tiempo de Exposición							
	Día 3	Día 7	Día 14	Día 22	Día 29	Día 37	Día 44	Día 47
Ensayo 1								
o (control)	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA
1	<LQA	<LQA	<LQA	0,02±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01
100	<LQA	0,01±0,00	0,11±0,04	0,09±0,02	0,21±0,04	0,16±0,02	0,17±0,03	0,15±0,03
1.000	<LQA	0,08±0,01	0,14±0,04	0,21±0,01	0,25±0,04	0,19±0,02	0,18±0,02	0,21±0,02

Los valores se expresan como el promedio ± el desvío estándar (N = 6).

LQA = Límite de cuantificación analítico

TABLA 2.7. CONCENTRACIONES DE AFM₁ MEDIDA EN EL MÚSCULO DE LOS PACÚES EXPUESTOS A TRAVÉS DEL ALIMENTO EN EL ENSAYO 1

Concentración AFM ₁ en alimento (µg kg ⁻¹)	Concentración promedio de AFM ₁ en músculo (µg kg ⁻¹)							
	Tiempo de Exposición							
	Día 3	Día 7	Día 14	Día 22	Día 29	Día 37	Día 44	Día 47
Ensayo 1								
o (control)	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA
1	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA
100	<LQA	<LQA	<LQA	0,02±0,00	0,03±0,00	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,00
1.000	<LQA	0,03±0,01	0,02±0,01	0,03±0,00	0,05±0,01	0,03±0,01	0,04±0,00	0,04±0,01

Los valores se expresan como el promedio ± el desvío estándar (N = 6).

LQA = Límite de Cuantificación analítico

TABLA 2.8. CONCENTRACIONES DE AFB₁ MEDIDA EN EL HÍGADO DE LOS PACÚES EXPUESTOS A TRAVÉS DEL ALIMENTO EN EL ENSAYO 1

Concentración AFB ₁ en alimento (µg kg ⁻¹)	Concentración de AFB ₁ en hígado (µg kg ⁻¹)							
	Tiempo de Exposición							
	Día 3	Día 7	Día 14	Día 22	Día 29	Día 37	Día 44	Día 47
Ensayo 1								
o (control)	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA
1	0,63±0,25	1,11±0,18	2,33±0,89	2,14±0,43	2,96±0,89	2,03±0,47	1,69±0,68	1,40±0,43
100	2,12±0,67	5,05±1,23	11,07±2,92	5,03±0,69	4,32±0,54	2,91±0,50	3,39±0,67	3,28±0,95
1.000	29,40±3,47	45,41±7,38	42,25±10,16	6,89±0,86	7,52±1,15	3,65±1,59	3,85±1,00	4,97±1,56

Los valores se expresan como el promedio ± el desvío estándar (N = 6)

LQA= Límite de cuantificación analítico

TABLA 2.9. CONCENTRACIONES DE AFM₁ MEDIDA EN EL HÍGADO DE LOS PACÚES EXPUESTOS A TRAVÉS DEL ALIMENTO EN EL ENSAYO 1

Concentración AFB ₁ en alimento (µg kg ⁻¹)	Concentración de AFM ₁ en hígado (µg kg ⁻¹)							
	Tiempo de Exposición							
	Día 3	Día 7	Día 14	Día 22	Día 29	Día 37	Día 44	Día 47
Ensayo 1								
o (control)	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA
1	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	0,58±0,34	0,62±0,16	1,65±0,67	1,85±0,98
100	<LQA	<LQA	<LQA	9,11±2,60	3,09±1,35	1,80±0,66	1,72±1,30	1,41±0,52
1.000	<LQA	<LQA	<LQA	26,57±8,00	6,61±1,76	3,12±1,22	2,05±1,45	2,02±0,62

Los valores se expresan como el promedio ± el desvío estándar (N = 6)

LQA= Límite de cuantificación analítico

Parámetros de bioacumulación de residuos de AFB₁ en músculo e hígado

Los parámetros del modelo toxicocinético (MTC) para los residuos de AFB₁ y AFM₁ en músculos e hígados del Ensayo 1 se muestran en la Tabla 2.10. Los valores fueron estimados a través de las Ecuaciones 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6. Las Figuras 2.4 y 2.5 representan el ajuste del modelo estimado versus los valores medidos para AFM₁ y AFB₁ en músculo e hígado respectivamente.

En particular se observó, que el BAF y el Tlag presentaron valores inversamente proporcionales a la concentración de AFB₁ en el alimento y se detectó un aumento en la constante de eliminación aparente de la toxina (K_e) en función de la concentración de toxina suministrada.

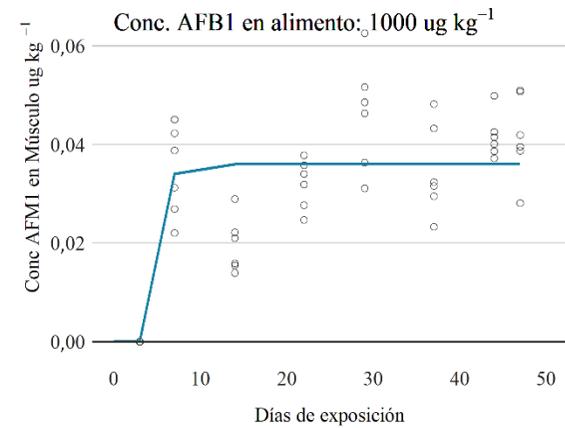
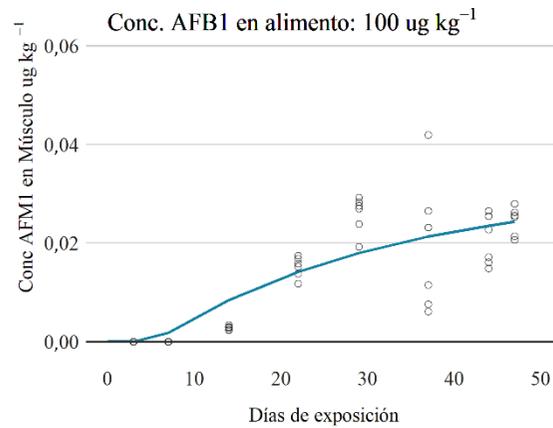
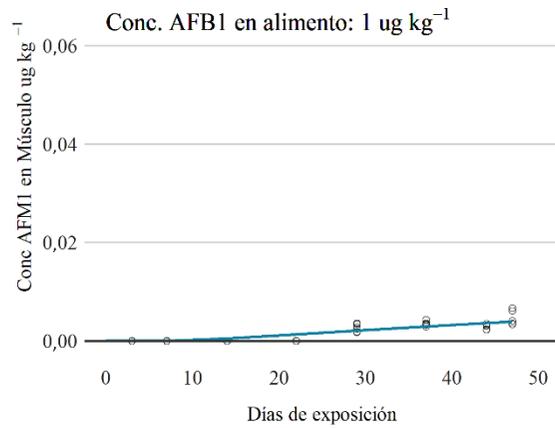
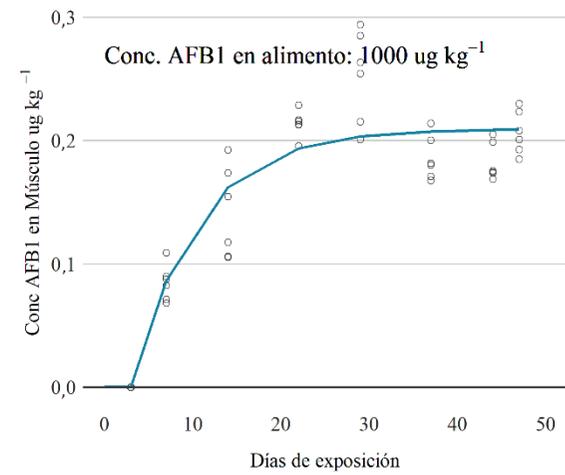
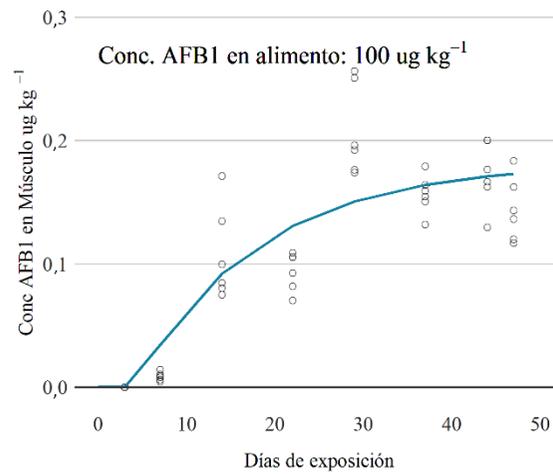
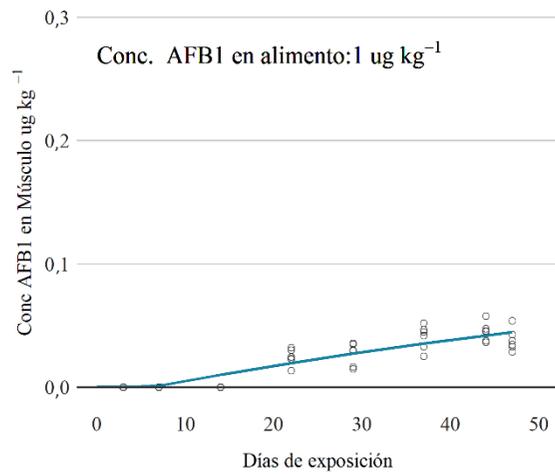
Las concentraciones predichas por el modelo a tiempo infinito (concentraciones de equilibrio) en músculo, tanto para AFB₁ como para AFM₁, coinciden con los valores empíricos como se muestra en las Tabla 2.6 y 2.7. En cambio, las concentraciones de equilibrio estimadas por el modelo en el hígado para AFB₁ y AFM₁, son mayores que los valores empíricos, producto del comportamiento particular que mostró la acumulación de la toxina y el metabolito (no monotónica) que el modelo de un solo compartimiento no es capaz de reproducir, probablemente, requiriéndose de un modelado más complejo que contemple más de un compartimiento.

El análisis particular de la AFM₁, indicó, que cuando la concentración de AFB₁ en el alimento es mayor a 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, se alcanza una concentración máxima cercana a los 0,04 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. A este nivel de exposición, las concentraciones de equilibrio en el músculo predichas por el modelo, coinciden con las detectadas. Por su parte, a concentraciones de exposición de 1 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, no se logró alcanzar el equilibrio en el tiempo del estudio, por lo que no se pueden realizar predicciones adecuadas con el modelo planteado.

TABLA 2.10. PARÁMETROS DEL MODELO TOXICOCINÉTICO DE PRIMER ORDEN DE UN SOLO COMPARTIMENTO (MTC) PARA RESIDUOS DE AFLATOXINA EN MÚSCULO E HÍGADO DE PACÚ EXPUESTOS EN EL ENSAYO 1.

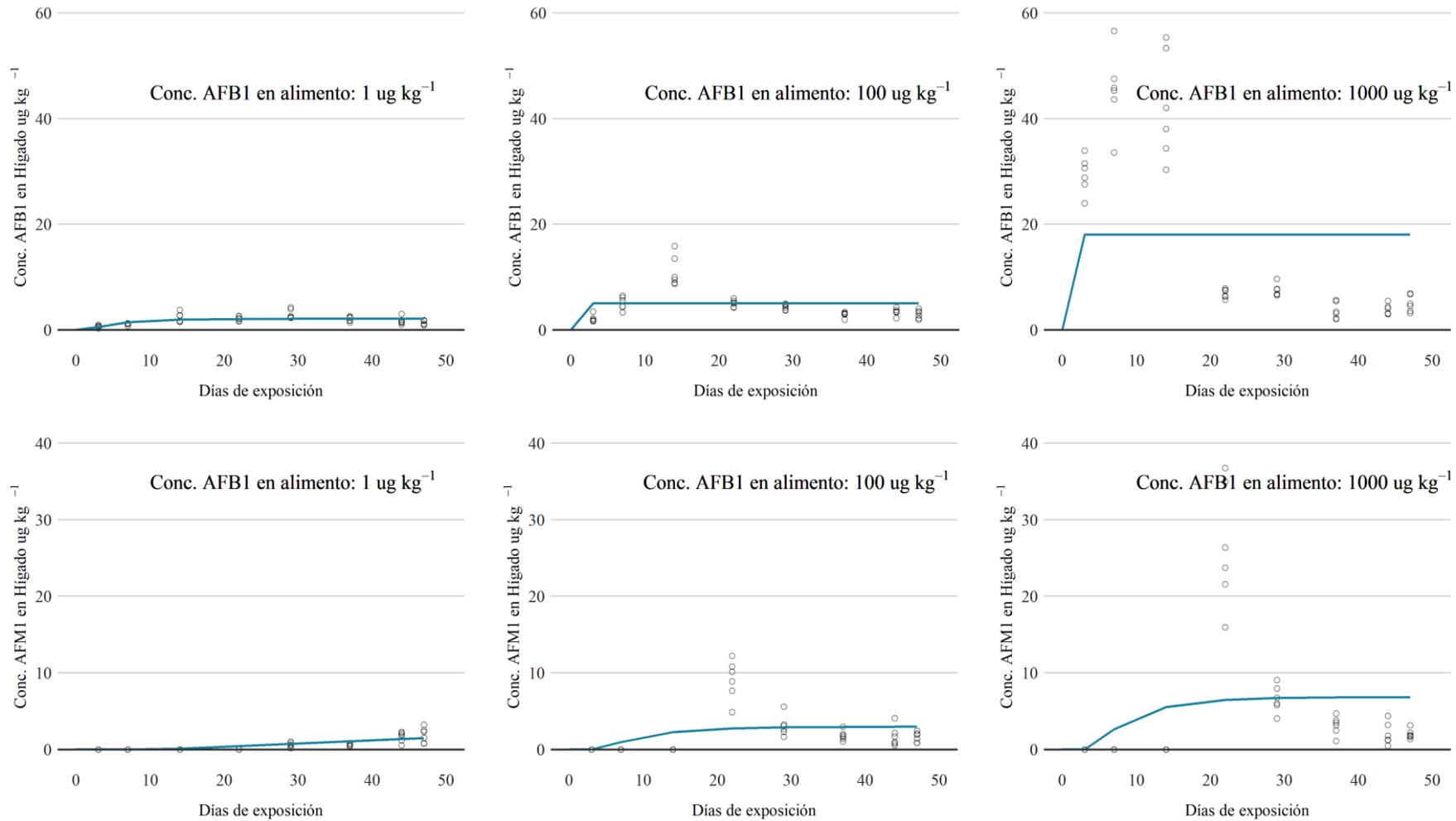
PARÁMETROS DEL MODELO	Concentración AFB ₁ en alimento ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	1	100	1000	1	100	1000
	<i>Músculo</i>			<i>Hígado</i>		
AFB₁						
CT _∞ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,127	0,182	0,210	2,085	5,007	17,992
T _{lag} (días)	6,2	4,0	3,1	1,6	0,8	0,5
K _e ($\mu\text{g/kg día}$)	1,054E ⁻⁰²	7,087E ⁻⁰²	1,363E ⁻⁰¹	2,117E ⁻⁰¹	2,630E ⁰	6,462E ⁰
K _u ($\mu\text{g/kg día}$)	1,343E ⁻⁰³	1,288E ⁻⁰⁴	2,856E ⁻⁰⁵	4,415E ⁻⁰¹	1,317E ⁻⁰¹	1,163E ⁻⁰¹
BAF	1,274E ⁻⁰¹	1,817E ⁻⁰³	2,095E ⁻⁰⁴	2,085E ⁰	5,007E ⁻⁰²	1,799E ⁻⁰²
AFM₁						
CT _∞ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,197	0,031	0,036	4974,222	2,969	6,822
T _{lag} (días)	9,1	5,4	3,0	11,1	4,3	4,1
K _e ($\mu\text{g/kg día}$)	5,292E ⁻⁰⁴	3,666E ⁻⁰²	7,278E ⁻⁰¹	8,286E ⁻⁰⁶	1,460E ⁻⁰¹	1,679E ⁻⁰¹
K _u ($\mu\text{g/kg día}$)	1,044E ⁻⁰⁴	1,140E ⁻⁰⁵	2,620E ⁻⁰⁵	4,121E ⁻⁰²	4,337E ⁻⁰³	1,145E ⁻⁰³
BAF	1,973E ⁻⁰¹	3,108E ⁻⁰⁴	3,600E ⁻⁰⁵	4,974E ⁺⁰³	2,969E ⁻⁰²	6,822E ⁻⁰³

BAF: Factor de Bioacumulación. CT_∞: Concentración a Tiempo Infinito. K_e : Tasa de eliminación. K_u: Tasa de absorción. T_{lag} :Tiempo de retardo



La curva azul, representa el modelo MTC

FIGURA 2.4. AJUSTE DEL MODELO MTC EN MÚSCULO, PARA 8 TIEMPOS DE EXPOSICIÓN EN PECES EXPUESTOS A ALIMENTO CONTAMINADO CON AFB₁ DURANTE 47 DÍAS



La curva azul, representa el modelo MTC

FIGURA 2.5. AJUSTE DEL MODELO MTC EN HÍGADO, PARA 8 TIEMPOS DE EXPOSICIÓN EN PECES EXPUESTOS A ALIMENTO CONTAMINADO CON AFB1 DURANTE 47 DÍAS

Eliminación de residuos de AFB₁ en músculo e hígado

La concentración promedio de residuos de AFB₁ y AFM₁ halladas en músculos e hígados del Ensayo 1 evaluada durante el período de depuración (días 48, 49 y 50), junto a sus coeficientes de variación para cada tratamiento ensayado, se presentan en la Tabla 2. 11. La tabla incluye el día 47 del ensayo como concentración inicial de la toxina en músculo e hígado. Se observó que tanto en músculo como en hígado la AFB₁ y la AFM₁ se eliminaron rápidamente durante las primeras 24 o 48 h de depuración.

Parámetros de Eliminación según modelo MTC para residuos de AFB₁ en músculo e hígado

Los parámetros del modelo toxicocinético (MTC) en la fase de eliminación, para los residuos de AFB₁ y AFM₁ en músculos e hígados del Ensayo 1 se muestran en la Tabla 2.12. Para la realización de esta tabla, los valores fueron estimados a través de la Ecuación 2.2. Las Figuras 2.6 y 2.7 representan el modelo planteado versus los valores medidos.

Las concentraciones de AFB₁ en el músculo fue menor que el LQA de la metodología utilizada, para el tratamiento de 1 µg Kg⁻¹, luego de 24 h de alimentación libre de micotoxinas, por lo que no se pudo calcular los parámetros del modelo MTC en este tratamiento. Para los tratamientos de 100 y 1000 µg Kg⁻¹, se detecta en el músculo el 34% y el 29% de la concentración máxima obtenida en cada tratamiento a las 24 h de alimentación libre de AFB₁ y a las 48h solo se detecta el 6% y 3% de este valor. Mientras que, a las 72 h no se detectan residuos en ningún tratamiento.

Por su parte, el hígado presentó perfil similar para todos los tratamientos, donde se puede observar una disminución de los residuos AFB₁ del 50-60% a las 24 h y 90% a las 48 h. Mientras que, a las 72 h, no se detectan residuos en ningún tratamiento.

Se observó que el tiempo medio de eliminación calculado fue de 20 h o menor para todas las concentraciones evaluadas, de AFB₁ y AFM₁. Las constantes de eliminación calculadas tuvieron un valor cercano a $1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, lo que indica la rápida eliminación de los metabolitos. Debido a la rápida eliminación y que algunos valores de acumulación se encontraban cerca de los límites de detección del método analítico, no se pudieron ajustar los modelos en algunas concentraciones, como se ve en la tabla como se observa en la tabla 2. 12.

TABLA 2.11. CONCENTRACIÓN HALLADA DE AFB₁ Y AFM₁ EN MÚSCULO E HÍGADO DE PACÚ CORRESPONDIENTE DURANTE EL PERIODO DE ELIMINACIÓN DEL ENSAYO 1

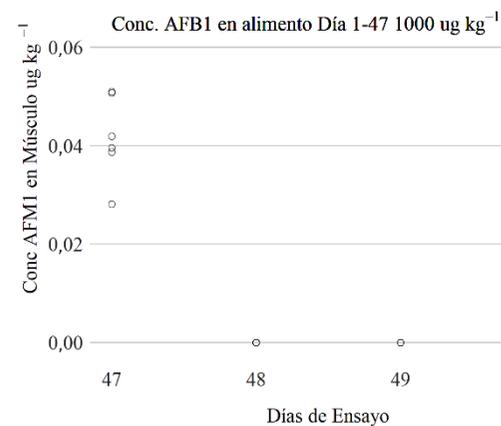
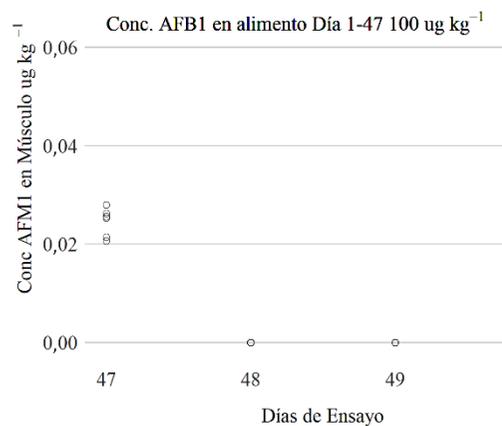
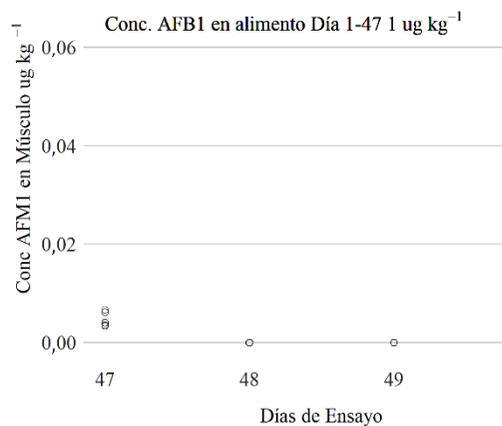
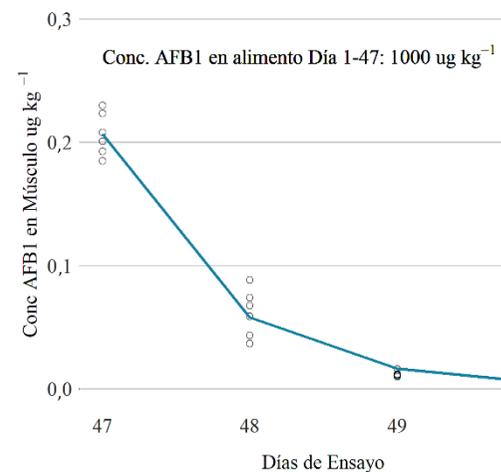
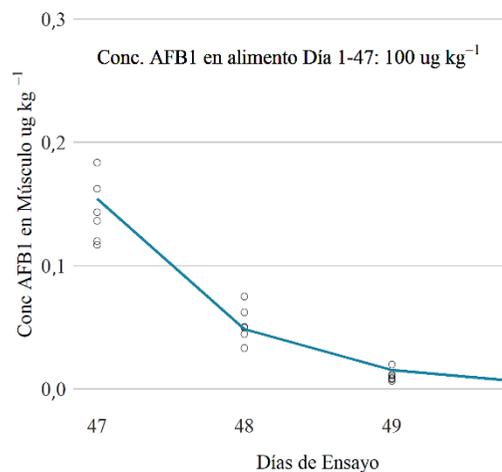
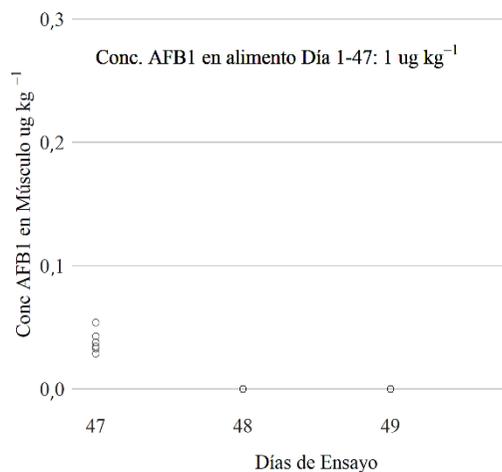
		<i>Ensayo 1</i>							
		Concentración de AFB ₁ (µg kg ⁻¹)				Concentración de AFM ₁ (µg kg ⁻¹)			
Músculo	Concentración AFB ₁ en alimento (µg kg ⁻¹)	Tiempo de Exposición							
		Día 47	Día 48	Día 49	Día 50	Día 47	Día 48	Día 49	Día 50
Músculo	o (control)	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA
	1	0,04±0,01	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA
	100	0,15±0,03	0,05±0,01	0,01±0,00	<LQA	0,02±0,00	<LQA	<LQA	<LQA
	1000	0,21±0,02	0,06±0,02	0,01±0,00	<LQA	0,04±0,01	<LQA	<LQA	<LQA
Hígado	o (control)	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA	<LQA
	1	1,40±0,43	0,76±0,20	0,19±0,03	<LQA	1,85±0,98	<LQA	<LQA	<LQA
	100	3,28±0,95	1,50±0,43	0,37±0,09	<LQA	1,41±0,52	0,61±0,21	<LQA	<LQA
	1000	4,97±1,56	2,05±0,35	0,42±0,16	<LQA	2,02±0,62	0,96±0,26	<LQA	<LQA

Los valores se expresan como el promedio ± el desvió estándar (N = 6) LQA= Límite de cuantificación analítico

TABLA 2.12 PARÁMETROS DEL MODELO TOXICOCINÉTICO DE PRIMER ORDEN DE UN SOLO COMPARTIMENTO (MTC) PARA RESIDUOS DE AFLATOXINA EN MÚSCULO E HIGADO DE PACÚ, CORRESPONDIENTE AL ENSAYO 1. ETAPA DE ELIMINACIÓN

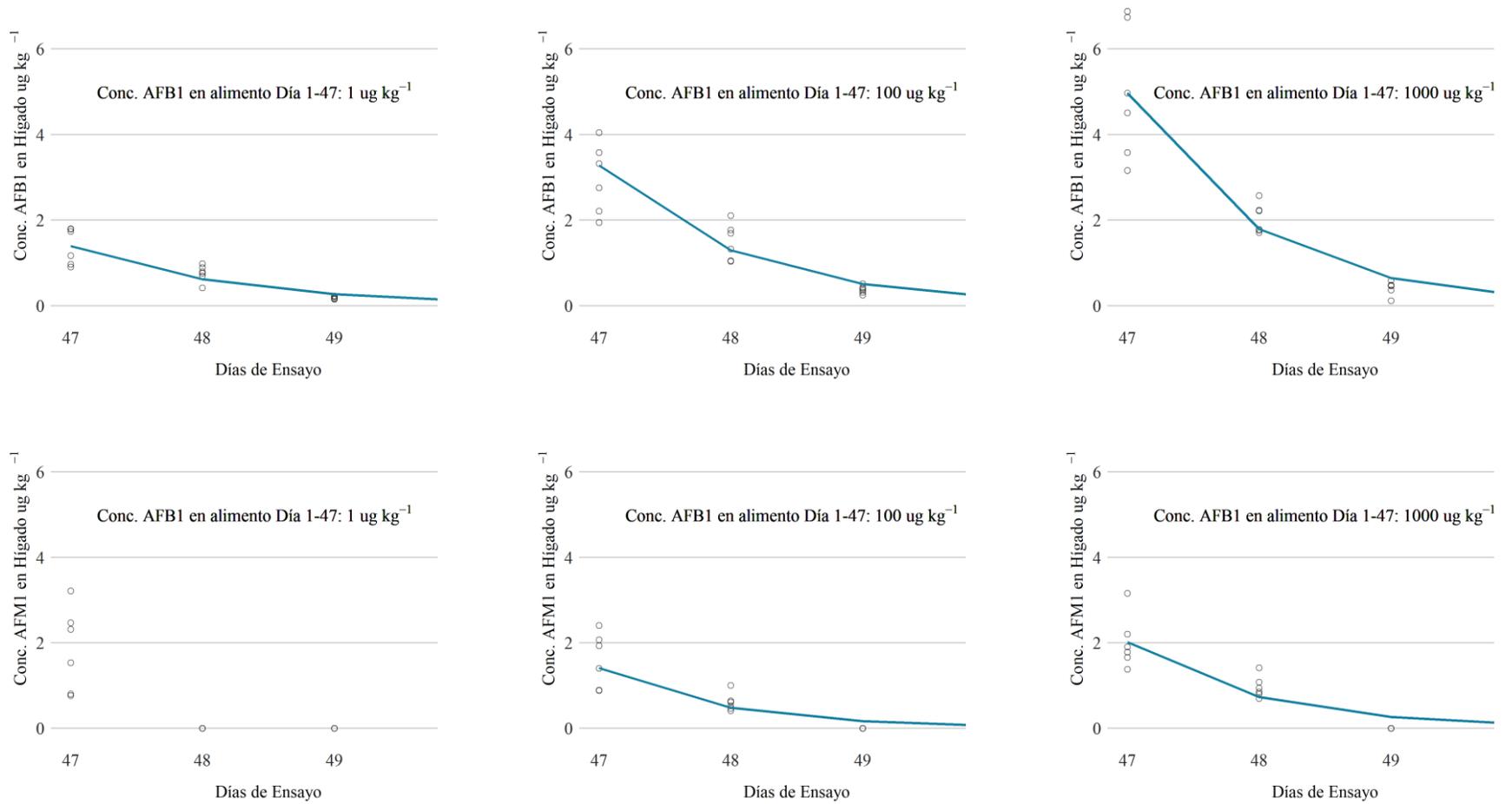
PARÁMETROS DEL MODELO	Concentración AFB ₁ µg kg ⁻¹ en alimento					
	1	100	1000	1	100	1000
	<i>Músculo</i>			<i>Hígado</i>		
AFB₁						
K _e (µg kg ⁻¹ día ⁻¹)	N/A	1,160	1,269	0,815	0,929	1,021
T	N/A	8,623E ⁻⁰¹	7,882E ⁻⁰¹	1,226E ⁰	1,076E ⁰	9,796E ⁻⁰¹
T _{1/2} (h)	N/A	14,345	13,112	20,400	17,902	16,295
AFM₁						
K _e (µg kg ⁻¹ día ⁻¹)	N/A	N/A	N/A	N/A	1,077	1,012
T	N/A	N/A	N/A	N/A	9,282E ⁻⁰¹	9,881E ⁻⁰¹
T _{1/2} (h)	N/A	N/A	N/A	N/A	15,442	16,438

N/A= El parámetro no pudo ser estimado por falta de datos con niveles detectables para correr el modelo utilizado.



La curva azul, representa el modelo MTC

FIGURA 2.6. AJUSTE DEL MODELO MTC EN MÚSCULO, PARA PERIODO DE DETOXIFICACIÓN EN PECES EXPUESTOS A ALIMENTO CONTAMINADO CON AFB₁ DURANTE 47 DÍAS



La curva azul, representa el modelo MTC

FIGURA 2.7 AJUSTE DEL MODELO MTC EN HÍGADO, PARA PERIODO DE DETOXIFICACIÓN EN PECES EXPUESTOS A ALIMENTO CONTAMINADO CON AFB₁ DURANTE 47 DÍAS

Discusión

Estabilidad del alimento

Al evaluar si la preparación de las dietas con la adición de las diferentes concentraciones de AFB₁ podría haber afectado la calidad del alimento balanceado, se observó que la estabilidad promedio del alimento en agua, expresada como pérdida porcentual de materia seca, fue menor al 20%. Por tanto, la preparación de la dieta no alteraría la capacidad de los alimentos. La bibliografía indica que, en aquellos alimentos que deben permanecer parcialmente sumergidos, su calidad es considerada apta si los valores de pérdida de materia seca son menores a 30%, y la pérdida de nutrientes podría considerarse mínima en tales alimentos (Aas et al., 2011; Oehme et al., 2014; SØRensen, 2012).

La medición de la concentración de AFB₁ en las dietas, mostró que los valores reales se encontraban dentro de los rangos aceptables respecto a los valores nominales. Los valores cuantificados representaron el 95% o más del valor nominal. Por lo que se utilizó para los cálculos el valor nominal, considerando que la EFSA establece que este debe ser el caso cuando la concentración medida representa al menos el 80% de la concentración nominal (EFSA 2014, 2018b).

A su vez, los análisis mostraron que la AFB₁ se añadió uniformemente al alimento y que el alimento control no presentaba residuos de contaminación con AFB₁.

Acumulación de residuos de AFB₁ y metabolitos en los tejidos del Pacú y parámetros toxicocinéticos

De acuerdo los objetivos plantados para el presente capítulo, uno de los hallazgos más relevantes respecto a la acumulación de residuos de AFB₁ pueden atribuirse al hecho que el valor máximo de residuos de AFB₁ y AFM₁ se alcanza independientemente de la dosis. Sin embargo, el tiempo para alcanzar ese equilibrio parece depender no sólo de la concentración,

sino también de la forma que se realice el ensayo. Se infiere que las concentraciones de residuos de AFB₁ y AFM₁ halladas en músculos e hígados provendrían de la metabolización de la AFB₁ suministrada en la dieta. Debido a la rápida eliminación de la toxina observada, prácticas comunes como privar por 24 h la alimentación a los peces antes de ser sacrificados, podrían afectar los resultados obtenidos.

Los resultados mostraron que el sistema de acumulación en músculo se satura rápidamente en aquellos tratamientos en los cuales la concentración de AFB₁ era elevada ($0,20 \pm 0,04 \mu\text{g kg}^{-1}$). Resultados similares han sido reportados para otras especies consideradas tolerantes a las aflatoxinas en los cuales sólo se detectaron residuos de AFB₁ y AFM₁ en los tejidos evaluados. Michelin et al. (2021a) reportaron valores para residuos de AFB₁ en musculo, comprendidos entre $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $0,09 \mu\text{g kg}^{-1}$ para Pacúes expuestos por 180 días de a 3 concentraciones de hasta 10, 20 y $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ en la alimentación. Debido a que este trabajo indica que los peces se encuentran en ayunas de 24 h antes de la eutanasia, podríamos indicar que los valores reportados, coincidirían con los resultados obtenidos debido a la rápida eliminación de la toxina.

Por su parte, los niveles de concentraciones halladas en músculo en los ensayos realizados, también se corresponderían a las reportadas para estas especies, como Trucha arcoíris o tilapia, o se encuentra por debajo los límites de detección de los métodos utilizados por estos autores (Deng et al. 2010, Nomura et al. 2011, Bedoya-Serna et al. 2018, Deng et al. 2020).

A su vez existe información para otras especies de peces, como la Mojarra (*Astyanax altiparanae*), donde a partir de los 90 días de exposición se detectan valores elevados de AFB₁ cercanos a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ y valores superiores a $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ luego de 120 días en los peces expuestos a alimentos contaminados con más de una aflatoxina (Michelin et al. 2017). Debido a que los ensayos realizados la presente tesis se realizaron a tiempos de exposición más cortos y no se

evaluó la sinergia entre distintas aflatoxinas, si tales factores son determinantes de niveles de acumulación tan elevados debería ser considerado para futuros ensayos.

El modelo toxicocinético utilizado, no fue adecuado para explicar los resultados de acumulación hepática. Los valores encontrados empíricamente no condijeron con los reportados para otras especies estudiadas a concentraciones de exposición similares. Hay concordancia en la bibliografía en que, por lo general, la sensibilidad selectiva hacia AFB₁ tanto en peces como en mamíferos, parece deberse a diferencias en el patrón de las enzimas que intervienen en el metabolismo de AFB₁. Esas diferencias podrían atribuirse a las diferentes isoenzimas del CYP₄₅₀ que se activarían y que modificarían el equilibrio entre las etapas de detoxificación de fase I y de fase II (Bailey et al. 1988).

Se observó que la acumulación de la AFB₁ en el hígado se incrementó y luego disminuyó abruptamente en pocos días y ello coincidió con el aumento de la acumulación de AFM₁. Este comportamiento atípico detectado en el estudio de acumulación en hígado durante los primeros días de ensayo, donde se observa una disminución de la concentración de AFB₁, podría ser explicado por la relación entre las distintos iso-enzimas CYP. Aunque es sólo una especulación, sería posible que se esté activando la metabolización de distintas iso-enzimas CYP₄₅₀, las cuales regularían su expresión y cinética en función de la concentración de AFB₁ y tiempo de exposición.

Se ha demostrado en mamíferos, que a bajas concentraciones de AFB₁, CYP_{1A2} hidroxila AFB₁ a su metabolito AFM₁ siguiendo un comportamiento cinético de Michaelis-Menten, dominando la metabolización de AFB₁ debido a su mayor afinidad. Sin embargo, debido al bajo valor de la constante de Michaelis-Menten (KM), la enzima se satura a concentraciones relativamente baja de sustrato (Gallagher et al. 1996, Neal et al. 1998). De un modo diferente, el CYP_{3A4} muestra modelo sigmoide con cooperación positiva típico de enzimas con regulación alostérica. Ello puede modular la velocidad de las vías metabólicas

en presencia de concentraciones elevadas de AFB₁, favoreciendo la actividad de detoxificación de CYP_{3A4} (Guengerich et al. 1996, Kelly et al. 1997, Guengerich et al. 1998, Guengerich 2006).

Yang et al. (2000) describen que el CYP_{2K1} de los peces, actúa en forma similar en la metabolización de AFB₁ a la contraparte humana, el CYP_{1A2}, para formar como metabolito principal AFM₁. Además, se ha determinado que el CYP_{3A4} humano es estructural y funcionalmente similar al CYP_{3A27} en peces, compartiendo las mismas localizaciones morfológicas de los tejidos y en ambos, la enzima posee dos sitios activos que transforman AFB₁ en el metabolito primario de detoxificación, la aflatoxina Q₁ (AFQ₁) y el metabolito carcinógeno AFB₁-8,9 epóxido (AFBO) (Guengerich 2006, Santacrose et al. 2007). La tasa de formación del AFBO y su conjugación con el glutatión son parámetros clave en las diferencias entre especies e interindividuales en la sensibilidad al efecto tóxico de la AFB₁ y su acumulación en los tejidos (Dohnal et al. 2014). Yang et al. (2000), especulan que la proporción de los productos AFBO/AFQ₁ podría ser modulada por sustancias endógenas o exógenas a través de una interacción alostérica, alterando así el riesgo de un individuo de desarrollar un cáncer.

Por su parte, Thiendedsakul et al. (2020) informó en estudios realizados sobre cocodrilos asiáticos (*Crocodylus siamensis*), que la cinética y perfiles de iso-enzimas responsables de la bioactivación de AFB₁ depende de la especie, la edad y el sexo, influyendo esta relación en el perfil de metabolitos obtenidos.

Al carecer de estudios similares para el Pacú, no podemos realizar correlaciones entre niveles de estas iso-enzimas con la de otros peces considerados tolerantes. Esta hipótesis debería ser comprobada con ensayos específicos que evalúen la expresión y/o actividad de las diferentes isoformas y, así, permitan tener una mayor comprensión de los mecanismos involucrados. Plantear alternativas para aprovechar la interacción del CYP₄₅₀ con sustancias endógenas o exógenas, los cuales escapan del objetivo este estudio.

Eliminación

Los hallazgos más relevantes respecto a la acumulación de residuos de AFB₁ a partir de los resultados obtenidos, muestran que las micotoxinas se depuran rápidamente y no se acumularía en los tejidos evaluados de esta especie a niveles superiores a los límites máximos de residuos para AFB₁ en alimentos. La vida media de eliminación de AFB₁, coinciden con los reportados para otra especie, como la Trucha arcoíris, en donde Nomura et al. (2011) detecta valores de 9,12 h en el músculo y 12,00 h en el hígado. En comparación con otros contaminantes más estudiados en peces, la tasa de eliminación de aflatoxinas fue 400 % o 300% superior que para OP a concentraciones bajas o elevadas, respectivamente (Hou et al. 2019). La vida media de eliminación fue entre 20 y 100 veces inferior, dependiendo del K_{ow} , que para los PCBs que, en carpa, varía entre 20 y 100 días (Tang et al. 2017).

En función de los resultados obtenidos, los tiempos de eliminación de la AFM₁ fueron tan rápidos, que para la estimación de los parámetros del modelo MTC de eliminación, se debería repetir el ensayo con tiempos de muestreo mucho más cortos. Sin embargo, este trabajo realiza un aporte importante en cuanto a la detección de este metabolito y la descripción, por primera vez para la especie, de su cinética tanto de acumulación como de eliminación.

Importancia de los residuos para el consumidor

Si bien se detectó la presencia de AFB₁ y AFM₁ en ambos tejidos estudiados, las concentraciones encontradas en músculo son inferiores a las referencias de la reglamentación internacional para otros alimentos. Los residuos máximos permitidos en su mayoría varían entre 4,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AFB₁ (Faulkner 2014), con particularidades en la unión europea en alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ o los cereales y todos los productos derivados de los cereales 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

En hígado, estos valores de referencia fueron excedidos, principalmente durante los primeros días de exposición, hasta que la toxina pareciera empezar a ser metabolizada y convertida en AFM₁.

Es importante considerar que recientemente varios países han actualizado parte de su reglamentación y han generado legislaciones especiales para alimentos destinados a la primera infancia, como ser la última actualización de Código Alimentario Argentino 2021 (ANMAT Resolución Conjunta 9/2021) donde, por ejemplo, los valores máximos permitidos se encuentran en 0,1 µg kg⁻¹ de AFB₁ en alimentos a base de cereales. Aunque son alimentos distintos, tomando dicha referencia, los valores encontrados en músculo excederían los valores máximos permitidos por el ANMAT.

Aunque, según la reglamentación actual, los niveles de acumulación de estos metabolitos no sería un problema para la salud de los consumidores, no hay que descartar los problemas que la ingesta crónica de aflatoxinas en los alimentos puede ocasionar en la población, y particularmente del impacto que tendría si la carne de pescado estuviera contemplada en estos estudios.

Los resultados del presente trabajo indican que el hígado sería el principal tejido para el metabolismo de AFB₁. Dado que aún no existen niveles establecidos de LMR para los residuos de micotoxinas en los peces, estudios posteriores deberían enfocarse en las concentraciones encontradas durante los primeros 14 días de exposición, considerado que los valores encontrados de AFM₁ y AFB₁ en hígado, son relativamente altos en comparación a los límites fijados para estas toxinas en otros alimentos.

Desde el punto de vista productivo es interesante evaluar lo que ocurre en el hígado luego de los 14 días de exposición, los resultados obtenidos indican que se activarían distintas vías de metabolización, por lo que se debe considerar que es el perfil de biomarcadores, puede variar según el tiempo de exposición. Esto, impediría representar correctamente mediante un

modelo toxicocinético general de un solo compartimiento a la acumulación de AFB₁ y sus metabolitos en el hígado.

El ensayo de eliminación demuestra que tanto el hígado como el músculo se depura en tiempo relativamente cortos comparados con otros tóxicos, y que la toxina es excretada rápidamente del organismo cuando los peces dejan de ser alimentados con la toxina. Las concentraciones de AFM₁ y AFB₁ encontradas en el músculo son, en relación con las dosis de AFB₁ suministradas en el alimento, sumamente bajas. Por lo que los resultados indicarían que el músculo no sería el mejor órgano para realizar la búsqueda de residuos de AFB₁ y sus metabolitos, con el objeto de identificar si los peces estuvieron o están siendo expuestos a través del alimento balanceado que se les provee.

La rápida eliminación detectada para todos los metabolitos en hígado y músculo, indicarían que el análisis de estos metabolitos no sería la mejor opción para detectar exposición crónica de los peces a AFB₁, y se deberían buscar otros biomarcadores más adecuados que permitan identificar la exposición y posibles consecuencias sobre los los peces, pero no respecto a su aptitud para el consumo humano.

Conclusiones Parciales

En el presente capítulo se estimó la cinética de bioacumulación de AFB₁ y AFM₁ en músculo e hígado de Pacú expuestos crónicamente a concentraciones subletales de AFB₁ en el alimento. Se estimó la cinética de eliminación, una vez remplazada la dieta contaminada por una dieta libre de AFB₁ y se estimaron valores máximos de residuos.

Las principales conclusiones alcanzadas son:

- El valor máximo de residuos de AFB₁ y AFM₁ se alcanza independientemente de la dosis de AFB₁ en el alimento, aunque el tiempo para alcanzar ese equilibrio es menor cuanto mayor es la dosis de AFB₁ en el alimento, variando según el tejido.
- La toxina es metabolizada y eliminada rápidamente dentro de las primeras 72 h de alimentación libre de AFB₁.
- Por las características de la molécula y las rutas de metabolización, las concentraciones de AFB₁ y AFM₁ encontradas en la fracción comestible (músculo) son inferiores a las referencias de la reglamentación internacional para otros alimentos.
- De acuerdo con la concentración y el tiempo de exposición a AFB₁ en el alimento, las concentraciones de AFB₁ y AFM₁ encontradas en hígado podrían exceder, en el Pacú, los límites máximos permitidos de AFB₁ estipulados para otros alimentos.

CAPÍTULO 3:

Toxicodinámica: estudio de los efectos adversos inducidos por exposiciones agudas y crónica de AFB₁ en el alimento

Introducción

Conocer el impacto que posee la contaminación de los alimentos por aflatoxinas en la salud de los peces es de gran relevancia para los establecimientos productivos, principalmente en especies autóctonas, donde la información al respecto es escasa. Ello en particular dado que muchos de los efectos reportados afectan directamente sobre la calidad del producto y finalmente la rentabilidad de la producción.

Los signos clínicos asociados a al consumo de aflatoxinas que han sido reportados en peces incluyen la palidez de las branquias, la alteración de la coagulación de la sangre, la disminución en las tasas de crecimiento y la falta de aumento de peso (Oliveira and Vasconcelos 2020). Se ha descrito que las aflatoxinas causan también una inhibición en el transporte de triglicéridos y que inducen la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). La alteración de la síntesis de proteínas y la disminución de la capacidad del cuerpo para movilizar la grasa son algunos de los efectos relacionados con la lesión hepática y el NAFLD que se observan comúnmente en los animales afectados por una aflatoxicosis temprana (Arana et al. 2014, Asbaghi et al. 2020, Nachit et al. 2021). Los signos visibles de tales efectos se asocian a infecciones, reducción de la tasa supervivencia, oscurecimiento/amarilleo del cuerpo y comportamiento anormal, reducción de la ingesta de alimentos, rechazo de alimentos, disminución de la ganancia de peso corporal y disminución de la capacidad reproductiva, como se observa en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Marijani et al. 2019), lubina (*Dicentrarchus labrax L.*) (El-Sayed and Khalil 2009), la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) (Zeng et al. 2019) o el camarón de la India (*Fenneropenaeus indicus*) (Ghaednia et al. 2013).

Susceptibilidad de las especies a aflatoxina, alteraciones hepáticas

La susceptibilidad y el metabolismo de los peces a las aflatoxinas parece depender de la edad, el sexo y la especie (Bedoya-Serna et al. 2018). La mayoría de los estudios concuerdan en que los peces en estadio juvenil son más susceptibles que los adultos y que especies como el bagre, el Salmón coho y el pez cebra son considerados altamente tolerantes a las AFB₁ (Jantrarotai et al. 1990, Santacroce et al. 2007). Contrariamente, la Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es la especie de pez más sensible a las aflatoxinas. La exposición crónica a bajas concentraciones de AFB₁ (0,4 µg kg⁻¹) ha demostrado aumentar las posibilidades de que la Trucha arco iris desarrolle cáncer (Oliveira and Vasconcelos 2020). Estas diferencias entre especies han sido atribuidas a diferencias en el metabolismo de la AFB₁ en el hígado y a la afinidad de los metabolitos derivados de esta toxina con las macromoléculas hepáticas (Santos et al. 2010). La toxicidad de las aflatoxinas está determinada por la eficacia de la especie para activar la detoxificación de AFB₁ mediante el CYP450 (Peña 2007). A modo de ejemplo, Bailey et al. (1988) evaluaron el contenido de isoenzimas del CYP450 en experimentos de inmunocuantificación, y reveló que el hígado de Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) contiene cantidades 5 veces menores de CYP2K1 a las de la Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Siendo considerada la Trucha arco iris como extremadamente sensible a la AFB₁, mientras que el Salmón coho es considerado tolerante (Hendricks et al. 1994).

Por el motivo expuesto anteriormente, resulta interesante evaluar la respuesta a la AFB₁ de las enzimas correspondientes al sistema de detoxificación de fase I, el cual está compuesto principalmente por la familia de enzimas del CYP450. El complejo del CYP450, o sistema de monooxigenasas de función múltiple, está comprendido por más de 100 genes que codifican para diferentes isoformas de enzimas caracterizadas por contener un grupo hemo en su estructura. Una de las isoformas de la CYP450 más utilizadas en estudios con peces

como indicador de exposición a sustancias orgánicas con grupos aromáticos es la codificada por el gen CYP1A y medida fluorométricamente a través de la actividad de 7-etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD) (Quabius et al. 2001). El CYP1A se localiza en el retículo endoplásmico y su expresión es específicamente inducida por algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y otros xenobióticos que poseen grupos aromáticos en su molécula como cafeína, AFB₁ y paracetamol (Zanger and Schwab 2013). Como se explicó en el Capítulo 2, Yang et al. (2000) describen que CYP2K1 de los peces, actúa en forma similar a la contraparte humana CYP1A en la metabolización de AFB₁.

Otra isoforma del CYP₄₅₀ es la evaluada mediante la actividad de la benziloxiresorufina-O-deetilasa (BROD) que generalmente se asocia en mamíferos a la expresión del gen CYP3A1. Esta es estructural y funcionalmente similar a la CYP3A27 en peces, compartiendo las mismas localizaciones de los tejidos y en que ambas transforman la AFB₁ en el metabolito primario de desintoxicación, la aflatoxina Q₁ (AFQ₁) y en el metabolito carcinógeno AFB₁-8,9 epóxido (AFBO) (Guengerich 2006, Santacrose et al. 2007).

En el Capítulo 2 también se mencionó que el CYP₄₅₀ participa en el metabolismo oxidativo de muchas sustancias endógenas, como los esteroides y los ácidos biliares, así como en la desintoxicación de una gran variedad de xenobióticos, favoreciendo su excreción o conjugación por parte de las enzimas del sistema de biotransformación de Fase II, como por ejemplo, la glutatión-s-transferasa (GST) (Timbrell 2008, Ziglari and Allameh 2013, Di Giulio et al. 2020). La GST cataliza la conjugación del glutatión, a nivel del átomo de azufre de la cisteína, con varios compuesto electrófilos favoreciendo la detoxificación de compuestos tóxicos, tanto de origen exógeno como endógeno, previamente oxidados por el sistema de biotransformación de Fase I (Cançado et al. 2005). Las GST citosólicas de las clases alfa y pi son abundantes en los hepatocitos y se ha observado que son inducibles por sustancias exógenas y carcinógenas como las aflatoxinas (Thiendedsakul et al. 2020).

Existen también numerosos polimorfismos en enzimas del sistema de biotransformación. Ya sea a nivel de las variantes heredadas de las enzimas metabolizadoras, los transportadores, los receptores y las moléculas de las cascadas de transducción de señales. Ello suele tener un impacto importante en la respuesta a los xenobióticos ya que la toxicidad de cualquier sustancia procesada por las enzimas del CYP450 dependerá de la eficiencia de las relaciones entre las reacciones de la Fase I a Fase II. Por tanto, el papel que desempeña la combinación de múltiples polimorfismos enzimáticos son un factor importante en la susceptibilidad a enfermedades inducidas por sustancias químicas y su respuesta tóxica intra e interespecífica (Nebert 1997, Dacasto et al. 2005, Tomalik-Scharte et al. 2008).

Por otra parte, entre las principales enzimas y parámetros a evaluar para analizar la función hepática, se encuentran las enzimas transaminasas, alanina aminotransferasas (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), y la fosfatasa alcalina (ALP). Estas se utilizan como marcadores séricos de la hepatotoxicidad, por lo que son útiles para investigar la salud de los animales. Las enzimas ALT y AST son enzimas intracelulares presentes en grandes cantidades en el citoplasma de los hepatocitos. Cuando los hepatocitos se dañan o se destruyen estas enzimas se liberan en la circulación sanguínea. La ALT está presente principalmente en el citoplasma de los hepatocitos, mientras que el 80% de la AST se encuentra en las mitocondrias de los hepatocitos. La ALP, es una enzima que se encuentra en el hígado y los huesos y es importante para descomponer las proteínas. Si los niveles de ALP en plasma son más altos de lo normal, es posible que el hígado sufra de alguna enfermedad o daño, como una vía biliar obstruida, o exista alguna enfermedad ósea (Michelin et al. 2021b).

Como indican Wolf and Wolfe (2005) la evaluación de las de las enzimas hepáticas, si bien son un parámetro importante para evaluar el efecto de la AFB₁ en peces, estos ensayos bioquímicos no se deberían utilizar como únicos parámetros para evaluar el daño hepático en peces. Para este tipo de análisis es deseable, además, cumplimentar con una evaluación histopatológica para determinar la existencia o el alcance de la toxicidad hepática. La menor

tasa de perfusión del hígado de los peces, la distribución homogénea de las enzimas de biotransformación y el hecho de que algunas enzimas no son fácilmente inducibles, son algunos de los factores por los cuales el autor avala esta postura.

A su vez, como se ha mencionado en el Capítulo 2, los aductos del ADN formados por la AFB₁ son moderadamente resistentes a los procesos de reparación del ADN. Esto provoca mutaciones en los genes y, por tanto, el desarrollo carcinomas hepatocelulares, los cuales deben ser evaluados mediante estudios histológicos (Yang et al. 2000, Ziglari and Allameh 2013, Dohnal et al. 2014).

Susceptibilidad de las especies a AFB₁, efectos sobre parámetros productivos

La literatura sobre acuicultura indica que para la mayoría de las especies de peces la exposición a AFB₁ provoca: mortandad atípica, prevalencia de enfermedades (debido a la reducción de las funciones de defensa del sistema inmune), disminución de la capacidad reproductiva, reducción de la ingesta, de alimentos y principalmente un efecto adverso en la tasa de crecimiento (SGR). Este último es uno de los principales efectos negativos en especies como la tilapia (*Oreochromis niloticus*), la Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), el esturión estrellado (*Acipenser stellatus*) y el pez gato iridiscente (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Deng et al. 2010, Santos et al. 2010, Gonçalves et al. 2018a, Jalilpour et al. 2018, Deng et al. 2020).

Sin embargo, desde 1990 se reportan especies de peces, principalmente de aguas cálidas, como el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), el Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y el pez cebra (*Danio rerio*) que muestran una menor sensibilidad a las aflatoxinas (Jantrarotai et al. 1990, Oliveira and Vasconcelos 2020). Por ejemplo, en un estudio realizado sobre bagre de canal expuestos a concentraciones de AFB₁ en las dietas de 100 a 2154 µg kg⁻¹, reveló que

tal nivel de exposición no fue capaz de causar reducción significativa en el aumento de peso o alteraciones a nivel histopatológico (Jantrarotai et al. 1990).

Entre los principales parámetros indicadores que se utilizan en los sistemas productivos para los que se han reportados efectos por el consumo de aflatoxinas sobre distintas especies de peces, podemos destacar: la supervivencia, el índice de condición, el índice hepatosomático, la tasa de crecimiento específico y la relación longitud-peso, entre otros (Anh Tuan et al. 2002, Ghaednia et al. 2013, Nunes et al. 2019, Anater et al. 2020, Hassaan et al. 2020). Estos parámetros son relevantes ya que impactan directamente sobre la productividad de los establecimientos acuícolas. A su vez brindan información sobre el estado de las poblaciones de peces porque: i) permiten convertir las ecuaciones relación longitud/peso en modelos de evaluación de poblaciones, ii) ayudan a estimar la biomasa y permitir obtener una estimación del estado de los peces y iii) permiten predecir enfermedades y mortandades. También permiten determina el período en el cual los peces acumulan una mayor biomasa en su cuerpo y permite determinar la época de los cambios en las condiciones fisiológicas relacionadas con la edad, sexo y hábitats diferentes (Froese et al. 2011, Bermúdez et al. 2012, Kara et al. 2017).

Efectos sobre la composición de la carne

El *Codex Alimentarius* define “carne” como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin”. La carne se compone de agua, proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos. En términos generales todas las carnes de pescado poseen rangos similares de contenido proteico, los mismos varían entre un 15 y un 24%, mientras que es el componente graso el que

ofrece mayores variaciones de acuerdo a la especie y el tipo de músculo de que se trate (Acuña Reyes 2013).

La composición en ácidos grasos de los lípidos (aceites y grasas) presentes la musculatura de los peces son ricos en ácidos grasos poli-insaturados. Como ejemplo, tienen ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido decahexanoico (DHA), conocidos popularmente como Omega-3. La ingestión de estos aporta beneficios para la salud en la protección frente a cardiopatías coronarias. También contribuye al desarrollo del cerebro y el sistema nervioso en fetos y niños, lo que es apreciado por los consumidores (Swanson et al. 2012).

La composición centesimal de la carne en la producción acuícola puede ser modificada mediante prácticas de producción y/o como un efecto indeseado causado por componentes en las dietas. El primer caso es una práctica corriente en la producción del Salmón, Trucha y diversos peces marinos para aumentar el nivel de ácidos grasos, pero no siempre deseable para otras especies, ya que cualquier modificación en la composición centesimal suele afectar las propiedades organolépticas, como el aroma y el sabor del filete característico de cada especie. Por ejemplo, la elevación en el tenor de la grasa puede conferir un excesivo sabor a pescado u otros sabores extraños a los filetes, característica que puede llegar a no ser deseable. Además, puede aumentar la rancidez de los filetes afectando la vida útil del producto (Chamorro et al. 2020, Milián-Sorribes et al. 2021).

De acuerdo con lo argumentado en los párrafos precedentes y considerando al pacú una especie de relevancia para la producción acuícola Argentina, como se ha expuesto en los Capítulos anteriores, en el presente Capítulo se plantean las siguientes hipótesis:

Hipótesis específicas

- *Los niveles de aflatoxinas comúnmente reportadas en los alimentos balanceados destinados a acuicultura inducen efectos letales que reducen la supervivencia del pacú en los sistemas de cría.*
- *Exposiciones a concentraciones subletales de AFB₁ en el alimento alteran parámetros enzimáticos, histológicos e indicadores de hepatotoxicidad.*
- *Exposiciones subletales a AFB₁ en el alimento, afectan el desempeño biológico y parámetros de calidad de carne (evaluada por la composición centesimal) del pacú.*

Objetivos particulares

- *Determinar cuáles son las concentraciones de AFB₁ en el alimento que inducen efectos letales en el Pacú.*
- *Evaluar la respuesta de las enzimas hepáticas del sistema de biotransformación de fase I (EROD, BROD) y de fase II (GST), junto a las transaminasas (ALP, AST) y la ALT, en relación con la concentración de proteínas totales y la histología hepática en juveniles de pacú expuestos a concentraciones subletales AFB₁ como indicadores de hepatotoxicidad.*
- *Analizar parámetros de desempeño biológico, índices de desempeño productivo, condición y composición centesimal de carnes en estadios tempranos de producción pacú expuestos a concentraciones subletales de AFB₁.*

Materiales y métodos

Estrategia experimental

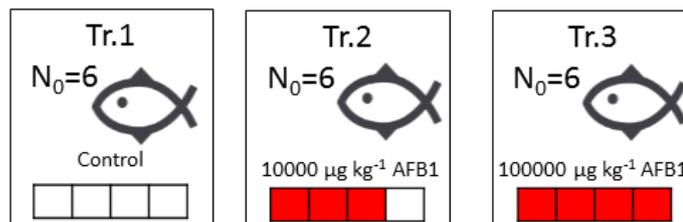
Para alcanzar los objetivos planteados en este capítulo se realizaron dos ensayos diferentes, uno de exposición aguda (Figura 3.1) y otro de exposición crónica (Figura 3.2).

Ensayo 2: Evaluación de efectos agudos

En este ensayo tuvo una duración de 14 días y se evaluaron 3 tratamientos, el Tratamiento 1 (E2Tr. 1) fue el grupo control y se alimentó con una ración libre de AFB₁ (R-0), el Tratamiento 2 (E2Tr. 2) fue alimentado con una ración que contenía AFB₁ en dosis de 10000 µg kg⁻¹ (R-10000) y el Tratamiento₃ (E2Tr. 3) fue alimentado con una ración que contenía AFB₁ en dosis de 100000 µg kg⁻¹ (R-100000). Los puntos finales evaluados fueron: porcentajes de mortalidad, crecimiento, descoloraciones y anomalías clínicas. Además, se recolectaron muestras músculo para el análisis de residuos de aflatoxinas. La preparación de los alientos fue realizada según la descripción de preparación de alimentos con AFB₁, en el capítulo 2 (TABLA 2.3).

Para el experimento, un total de 18 juveniles de Pacú, con un peso promedio de 13,04 ± 3,53 gramos, fueron divididos en forma aleatoria en 3 grupos iguales de 6 individuos cada uno, en peceras de vidrio de 90 L con aireación suave, fotoperiodo controlado: 16 horas luz: 8 horas oscuridad y temperatura controlada a 30±3 °C, en las instalaciones del ITA-CIA-INTA. Todos los peces fueron alimentados dos veces al día durante 2 semanas (14 días) sucesivas, a una tasa del 3% de biomasa de cada pecera, con diferentes concentraciones de AFB₁ a través del alimento. La dosis de alimento suministrado se ajustó semanalmente, en función de la biomasa total, para mantener el porcentaje constante. Al final de la exposición, se tomaron muestras de plasma, hígado, mucus y músculo para análisis histológicos y químicos.

Diariamente se registró la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH para todas las peceras, el 30% (30 litros) del volumen de agua fue renovada cada 48 h para cada pecera, durante todo el ensayo.



Tiempo de toma de muestras: 14 días

Peces Muestreados

6 x tratamiento = Total 18

Tr= tratamiento, N_0 = peces al comienzo del ensayo en cada pecera, AFB_1 = Aflatoxina B_1

FIGURA 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL ESTUDIO DE EFECTOS AGUDOS PRODUCIDOS POR INGESTA DE AFB_1 EN PACÚ.

Ensayo 3: Evaluación de efectos crónicos

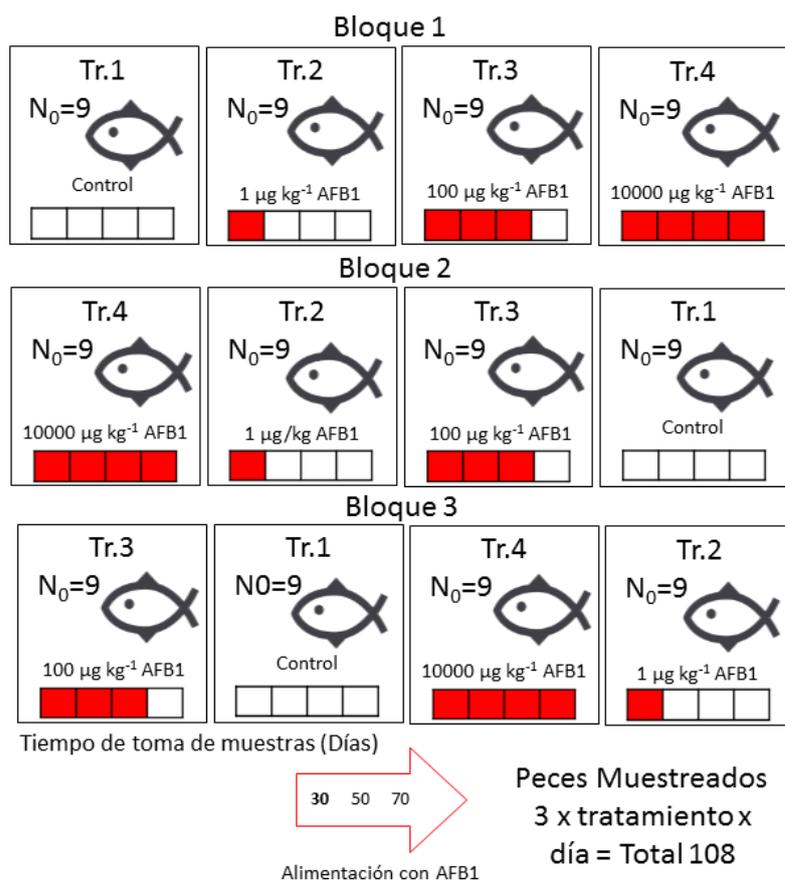
El diseño experimental consistió en la combinación de cuatro niveles de concentración de AFB_1 en el alimento (0, 1, 100 y 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y tres tiempos de exposición (30, 50 y 70 d). Los puntos finales evaluados fueron: el porcentaje de mortalidad, el crecimiento, descoloraciones y anomalías clínicas indicadoras del desempeño biológico de los peces, parámetros histológicos y enzimáticos sobre hígado, además del análisis de composición centesimal y de residuos de aflatoxinas en el músculo.

El Tratamiento 1 (E3Tr.1) fue alimentado una ración libre de AFB_1 (R-0). El tratamiento 2 (E3Tr.2) fue alimentado con una ración que contenía AFB_1 en dosis de 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (R-1), el tratamiento 3 (E3Tr.3) fue alimentado con una ración que contenía AFB_1 en dosis de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (R-100) y el tratamiento 4 (E3Tr.4) fue alimentado con una ración que contenía AFB_1 en dosis de 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (R-10000). Todos los grupos recibieron los cuatro

tratamientos y el orden de las peceras dentro de los grupos fue aleatorio. A los días 30, 50 y 70 se registró porcentaje de mortalidad, factores de crecimiento, descoloraciones y anomalías clínicas para evaluar el desempeño biológico. Se tomaron muestras de plasma, bilis, hígado, mucus y músculo para ensayos histológicos, cuantitativos y detección de biomarcadores.

Para el experimento, un total de 108 juveniles de Pacú, con un peso promedio de $16,06 \pm 3,56$ gramos, se dividieron en forma aleatoria en 3 grupos (bloques) formados por cuatro peceras de 9 individuos cada una. El ensayo fue realizado en las instalaciones del ITA-CIA-INTA, las peceras presentaron iguales condiciones de capacidad, aireación, fotoperiodo y temperatura que el Ensayo 2. Todos los grupos fueron alimentados dos veces al día durante 10 semanas (70 d) sucesivas a una tasa del 3% de la biomasa de cada pecera. La dosis de alimento suministrado se ajustó semanalmente, en función de la biomasa total, para mantener el porcentaje de toxina constante.

Las condiciones de ensayo fueron las mismas que en el Ensayo 1 (capítulo 2) y se realizó un mantenimiento y control diario de las peceras, registrando la temperatura, oxígeno disuelto, pH y realizando renovación de agua al 30%.



Tr = tratamiento, N₀ = peces al comienzo del ensayo en cada pecera, AFB₁ = Aflatoxina B₁
 FIGURA 3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL ESTUDIO DE EXPOSICIÓN CRÓNICA A AFB₁ EN PACÚ

Índices de desempeño productivo y parámetros condición

Tanto en el Ensayo 2 como el Ensayo 3 se registraron, en cada toma de muestras, el número de peces vivos por pecera, el peso y longitud corporal y el peso del hígado. Con estos valores se calcularon diferentes índices y parámetros de condición y desempeño productivo (Ogle and Winfield 2009, Takahashi et al. 2011, Bermúdez et al. 2012, Kara et al. 2017).

A partir de los datos recolectados en el Ensayo 2 se calculó el siguiente punto final:

$$\text{Supervivencia (\%)} = 100 \times \frac{\text{número de peces vivos al final del ensayo}}{\text{número inicial de peces}} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

A partir de los datos recolectados en el Ensayo 3 se calcularon los siguientes puntos finales:

$$\text{Índice de condición (K)} = 100 \times \frac{\text{peso corporal medio final}}{\text{longitud corporal media final}^3} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

$$\text{Índice hepatosomático (HSI)} := 100 \times \frac{\text{Peso de hígado}}{\text{Peso corporal}} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

$$\text{Crecimiento específico (SGR)} := 100 \times \frac{(\text{Ln}(\text{peso final}) - \text{Ln}(\text{peso inicial}))}{\text{días}} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

$$\text{Relación longitud/peso (WT)} := a \times L^b \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

Las relaciones de longitud-peso de los peces correspondientes al Ensayo 3 se obtuvieron mediante regresión lineal calculando los valores de a y b de la ecuación (3.5), donde WT es el peso total en gramos y L la longitud en cm. La ecuación 3.6 se obtuvo de aplicar transformación logarítmica a la relación entre longitud y peso en peces 3.5.

$$\log(\text{WT}) := \log(a) + b \times \log(L) \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

La fórmula evalúa el tipo de crecimiento, cuando un pez exhibe un crecimiento isométrico ($b = 3$) su peso incrementa en forma proporcional a su longitud, cuando esto no sucede se da un crecimiento alométrico que puede ser alométrico negativo ($b < 3$) cuyo patrón de crecimiento corresponde a aquellas especies en la que individuos de mayor talla son más elongados que los pequeños o crecimiento alométrico positivo ($b > 3$) que es acorde con una tendencia de aumento progresivo de la robustez desde formas tempranas más elongadas o delgadas, por lo cual hay una mayor ganancia proporcional en peso que en longitud,

fenómeno que es común entre los peces como el pacú (Froese 2006, Froese et al. 2011, Jellyman et al. 2013).

Histología

Para el análisis de los efectos histopatológico, se tomó una submuestra de los hígados de cada uno de los peces del Ensayo 3 y fueron fijadas en Reactivo de Bouin a 4 °C durante 24h y luego pasadas a alcohol 70 %. Se montaron en bloques de parafina, para realizar luego cortes histológicos de 6 a 8 µm de grosor para finalmente colorearlos con tinción hematoxilina-eosina (Gutiérrez 1967) (Anexo Protocolos-Histología). Los preparados se observaron al microscopio óptico de campo claro. En los 108 hígados correspondiente al Ensayo 3, las alteraciones observadas fueron evaluadas semi-cuantitativamente mediante la adaptación de un diseño de puntuación histológica para “Aspectos patológicos de la enfermedad hepática grasa” descrito por Panqueva (2014) y a la “Clasificación histológica para hígado graso no alcohólico” propuesta por (Arab et al. 2014). Si bien estos trabajos hacen referencia al daño en hígado humano, resultaron útiles para este estudio en peces. Además, los daños hepáticos microscópicos se caracterizaron según el grado de severidad de la lesión, obedeciendo a los criterios establecidos por Wolf and Wolfe (2005) y Boorman et al. (1997).

Las principales características evaluadas para describir daño hepático no alcohólico fueron esteatosis o cambio graso, inflamación y lesión hepatocelular según lo descrito por Panqueva (2014). Se consideró:

- esteatosis como una combinación de vacuolas pequeñas y grandes, su severidad se gradúa teniendo en cuenta la cantidad de hepatocitos comprometidos por las vacuolas grasas.
- inflamación como la presencia de neutrófilos polimorfonucleares que se disponen en pequeños cúmulos rodeando a los hepatocitos.
- lesión hepatocelular como:
 - balonización hepatocelular, dada por edema del citoplasma, son células agrandadas, de apariencia clara, con material residual granular, Los hepatocitos balonizados se encuentran típicamente en zonas con esteatosis y se acompañan de cuerpos hialinos de Mallory-Denk.
 - fibrosis celular, dada por la acumulación de colágeno en el espacio intercelular y puede extenderse hacia el espacio porta.

A cada parámetro (inflamación, esteatosis y balonización y/o fibrosis celular) se le asignó un puntaje que fue de 0 (ausencia), 1 (leve), 2 (moderada) o 3 (grave), adaptado de Kleiner and Brunt (2012) y resumido en la Tabla 3.1.

TABLA 3.1. PUNTAJE ASIGNADO ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO

Grado de severidad	Inflamación	Esteatosis	Balonización y/o fibrosis celular
Grado 0 (ausencia)	No se detectan focos por campo óptico x20	< 5% hepatocitos comprometidos	No se detectan
Grado 1 (leve)	< 2 focos por campo óptico x20	5-33% hepatocitos comprometidos	Balonización: ocasional.
Grado 2 (moderada)	2-4 focos por campo óptico x20	33-66% hepatocitos comprometidos	Gran cantidad de células/balonización prominente
Grado 3 (grave).	> 4 focos por campo óptico x20	> 66% hepatocitos comprometidos	

El grado de severidad del daño histológico se evaluó mediante la suma de cada parámetro analizado para cada concentración a un tiempo dado y promediado entre las distintas réplicas. La relación entre la puntuación y el diagnóstico resulta de cómo ha sido creada la puntuación, ya que ésta incorporaba las principales características histológicas (aparte de la fibrosis) que los patólogos utilizan para hacer el diagnóstico de enfermedades hepáticas. Al desconocerse la existencia de índices similares para peces, dada la extrapolación entre diferentes grupos taxonómicos, esta clasificación debe considerarse de carácter indicativo.

Respuestas biológicas a nivel bioquímico

Para el análisis de respuesta a nivel bioquímico, se disectó una submuestra de 0,2 g de los hígados extraídos de cada uno de los peces del Ensayo 3 y se conservó a -80°C.

Preparación de homogenato de hígado

En baño de hielo, 100 miligramos de cada una de las muestras se homogeneizaron en 400 µl de solución tampón pH 7.8 (Tris-HCl 20 mM, sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, KCl 150 mM) utilizando un homogeneizador PRO Bio-Gen PRO200 (PRO Scientific Inc) mediante tres golpes a 15.000 r.p.m. por 5 s separados por intervalos de 3 s siguiendo la metodología descrita por López Aca et al. (2018). Los homogenatos fueron luego centrifugados a 10.000 g durante 20 min a una temperatura de 4°C para obtener la fracción S₉ (post mitocondrial) en una centrífuga SIGMA2-16PK (Sigma Laborzentrifugen GmbH). El sobrenadante se separó en cuatro alícuotas almacenadas a -80 °C hasta la medición de los biomarcadores analizados en hígado (EROD, BROD, GST, ALT, AST ALP). Además, se determinó en cada sobrenadante la concentración de proteínas totales.

Proteínas totales

La concentración de proteínas fue evaluada utilizando una adaptación del método descrito por Lowry et al. (1951). El método fue modificado y adaptado en el laboratorio para lector de microplacas según Akins and Tuan (1995), usando 25 µl del homogeneizado y leyendo la absorbancia (660 nm) de cada muestra por triplicado frente a una curva de calibración construida a partir de un estándar de albúmina de suero bovino. La absorbancia se midió utilizando un lector de microplacas multimodo Synergy HT (BioTeck Instruments Inc.) con una corrección de longitud del recorrido óptico de 1 cm. A 25 µl de homogeneizado, se añadieron 250 µl de solución ABC (10 ml de Na₂CO₃ al 20 % en NaOH, 0,1 ml de tartrato de potasio al 2 % y 0,1 ml de CuSO₄ 1 %) y 25 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu fenol 1 N, se lo incubó en microondas (potencia máxima) durante 10 s y se midió la absorbancia a 660 nm.

Actividad EROD y BROD

La actividad enzimática EROD y BROD se midieron siguiendo la metodología descrita por Quabius et al. (2001), adaptando el método para lector de microplacas. A 10 μl de homogenato se añadieron 290 μl de solución tampón de reacción (Tris 50 mM, MgCl_2 25 mM, pH 7,5, NADPH 47 mM y 7-etoxiresorufina o bencilresorufina 0,5 mM). Cada muestra se analizó por triplicado y se leyó fluorométricamente la producción de resorufina cada 1 min durante 20 min a λ_{ex} 530 nm y λ_{em} 590 nm utilizando microplacas negras (Microfluor®). La cuantificación se realizó frente a una curva de calibración externa de cinco puntos del estándar de resorufina incluida en la misma microplaca. Las muestras fueron medidas en un lector de microplacas multimodo Synergy HT (BioTeck Instruments Inc.). Los resultados obtenidos se normalizaron frente a la concentración de proteínas totales en el homogenato, expresando la actividad EROD en ($\text{pmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Actividad GST

La actividad GST se midió espectrofotométricamente a 25 °C con glutatión reducido (GSH) y 1-cloro-2, 4-dinitrobenceno (CDNB) como sustratos y utilizando como solución buffer tampón de reacción fosfato de potasio 0,1 mM (pH 7,0). Se siguió el protocolo descrito por Stephensen et al. (2002), con modificaciones menores. El método fue adaptado para lector de microplacas, agregando 290 μl de solución tampón de reacción a 10 μl de homogenato y leyendo la absorbancia a 340 nm utilizando un lector de microplacas multimodo Synergy HT (BioTeck Instruments Inc.) con una corrección de longitud del recorrido óptico de 1 cm. Cada muestra fue medida por triplicado. Los resultados obtenidos se normalizaron frente a la concentración de proteínas totales en el homogenato, expresando la actividad GST en ($\text{pmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Fosfatasa alcalina (ALP)

El fundamento del método se base en que la fosfatasa alcalina desdobla al fenil-fosfato de sodio en medio alcalino tamponado con aminometil propanol (AMP). El fenol liberado se determina por reacción con 4-aminoantipirina y ferricianuro como agente oxidante. El color desarrollado es directamente proporcional a la actividad enzimática y se mide a 520 nm. La técnica fue adoptada a partir del Kit de Wiener Lab, “Fosfatasa alcalina optimizada” (WIENER LAB, Rosario Argentina). La lectura de las muestras fue realizada a longitud de onda 520 nm utilizando un lector de microplacas multimodo Synergy HT (BioTeck Instruments Inc.). La temperatura de reacción fue de 30°C y el tiempo de reacción de 10 minutos. A 5 µl del homogenato de hígado se les agregaron 5 µl de solución 14 mM de fenilfosfato de sodio en 4-aminoantipirina y aminometil propanol. A los 10 minutos exactos se interrumpió la reacción agregando solución de ferrocianuro de potasio. Las muestras fueron analizadas por triplicado y se valoraron contra solución patrón de fenol 200 UI/l, la cual fue tratada igual que el resto de las muestras.

Aspartato aminotransferasa (AST)

La técnica se adaptó a partir del Kit de Wiener Lab “Método UV optimizado (IFCC) para la determinación de aspartato aminotransferasa (GOT/AST)” (WIENER LAB, Rosario Argentina). Las lecturas de las muestras se realizaron a longitud de onda de 340 nm y a intervalos de 1 minuto desde el comienzo de la reacción por un tiempo total de 10 minutos, utilizando un lector de microplacas multimodo Synergy HT (BioTeck Instruments Inc.). La temperatura de reacción fue de 30°C y el volumen de muestra fueron 5 µl de una dilución 1/20 del homogenato de hígado en tampón pH 7.8. La metodología mide el pasaje de 2-oxoglutarato a oxalacetato mediado por AST a través de la reacción del oxalacetato formado,

a L-malato, catalizado por la enzima malato deshidrogenasa. Las muestras se analizaron por triplicado y valoraron calculando el diferencial de absorbancia en función del tiempo.

Alanina aminotransferasa (ALT)

La técnica se adaptó a partir del Kit de Wiener Lab “Método UV optimizado (IFCC) para la determinación de alanina aminotransferasa (GPT/ALT)” (WIENER LAB, Rosario Argentina). Las lecturas de las muestras se realizaron a una longitud de onda de 340 nm a intervalos de 1 minuto desde el comienzo de la reacción por un tiempo de 10 minutos, utilizando un lector de microplacas multimodo Synergy HT (BioTeck Instruments Inc.). La temperatura de reacción fue de 30°C y el volumen de homogenato de hígado utilizado fue de 5 µl. La metodología mide el pasaje de 2-oxoglutarato a piruvato mediado por ALT, a través de la reacción del piruvato formado, a L-lactato, catalizado por enzima lactato deshidrogenasa. Las muestras se analizaron por triplicado y valoraron calculando el diferencial de absorbancia en función del tiempo.

Composición centesimal/análisis proximal de carnes

Para evaluar la composición centesimal, se tomaron muestras de la porción comestible del músculo dorsal de cada ejemplar del Ensayo 3 y se realizaron las siguientes determinaciones:

Determinación del contenido proteína (P)

Para la determinación de contenido porcentual de proteínas en músculo, se molieron 2 g de filete de pescado, se pesaron en un vidrio de reloj y fueron sometidos a procesos de digestión y destilación de acuerdo a el método Kjeldahl. La metodología utilizada estuvo basada en Thiex et al. (2002), con algunas modificaciones menores. El instrumental utilizado fue un equipo analizador de nitrógeno marca FOSS conformado por una unidad de auto

digestión Tecator TM 2520, una unidad de neutralización de vapores ácidos Tecator y una unidad de auto destilación Kjeltex TM 2200.

La cantidad de proteína de la muestra se calculó como porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor de corrección (6.25) que por defecto se utiliza para carnes. El porcentaje de nitrógeno se calculó mediante la titulación del anión borato con ácido clorhídrico según la fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(T - B) \times 14,007 \times N \times 100}{\text{Peso de muestra (mg)}} \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

Siendo

T: Volumen de ácido clorhídrico utilizado en la titulación de la muestra.

B: Volumen utilizado para la titulación del blanco.

N: Normalidad de la solución de ácido usada.

Determinación del contenido materia grasa (MG)

La metodología utilizada, se basó en el método Bligh-Dyer (Perry 1959). Se molieron 2 g de filete de pescado y se pesaron en un tubo Falcon de 50 ml. La muestra fue luego homogenizada en 3 ml de agua destilada, 8 mL de metanol y 4 mL de cloroformo. Seguido se agregaron 4 ml de agua destilada y 4 ml de cloroformo. Se separaron las fases por centrifugación y se extrajeron 10 ml de la fase orgánica (cloroformo/metanol). La fase orgánica fue filtrada y evaporada a 60°C en un tubo de vidrio, previamente pesado. La materia grasa se determinó en porcentaje del extracto evaporado respecto el peso de la muestra inicial.

$$MG = 100 \times \frac{\text{peso de extracto evaporado}}{\text{peso de muestra inicial}} \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

Determinación del contenido porcentual de humedad (Hu)

La metodología utilizada se basó en la técnica AOAC Official Method 950.46. Se molieron 2 g de filete de pescado y se pesaron en un vidrio de reloj (peso de la muestra húmeda). Luego, la muestra se colocó en estufa a 105 °C durante 10 h. Se pesó la muestra nuevamente, repitiendo el procedimiento hasta pesos constante (peso de la muestra seca). Finalmente, se calculó el porcentaje de agua como la diferencia entre el peso de la muestra húmeda y seca. La muestra fue reservada para el análisis de cenizas.

$$Hu = 100 \times \frac{\text{peso de la muestra húmeda}}{\text{peso de la muestra seca}} \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

Determinación del contenido cenizas (A)

La metodología utilizada se basó en la metodología AOAC 920.153. Se pesó la muestra utilizada para determinación del contenido porcentual de humedad en un crisol de porcelana limpio y seco (resistente a 600 °C) y se registró como “Peso de la muestra (g)”. El peso del crisol junto con la muestra fue registrado como “Peso del crisol con muestra (g)”. El crisol junto con la muestra fue colocado en la mufla a una temperatura de 550 °C por un tiempo de 3 horas. Se dejó enfriar la muestra en un desecador y se procedió a pesar nuevamente. Luego fue colocado en la mufla por un tiempo 30 minutos a 600 °C y se repitió el ciclo de enfriado/pesado hasta peso constante en 2 determinaciones consecutivas. El peso Registrado fue “Peso del crisol con cenizas (g)”. Se procedió a calcular el contenido de cenizas porcentual

$$A = 100 \times \frac{\text{Peso crisol con muestra (g)} - \text{Peso crisol con cenizas (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \quad (\text{Ecuación 3.11})$$

Determinación del contenido porcentual de carbohidratos (C)

Se obtuvo restando al 100 % los valores obtenidos del análisis proximal para proteínas, humedad, grasas y cenizas de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C = 100 - P - Hu - MG - A \quad (\text{Ecuación 3.12})$$

Determinación de energía (E)

Se obtuvo utilizando los valores obtenidos del análisis proximal para contenido materia grasa y porcentaje de proteínas mediante la fórmula:

$$E = MG \times (9 \text{ kcal}) + P \times (4 \text{ kcal}) \quad (\text{Ecuación 3.13})$$

Análisis de datos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa R (R Development Core Team 2013) y los paquetes estadísticos lme4 y nlme (Bates et al. 2015). El análisis se basó en plantear un modelo lineal anidado de efectos mixtos para evaluar la relación entre los parámetros evaluados, el tiempo de exposición y la concentración de AFB₁ en el alimento para el Ensayo 3. Como efectos fijos en el modelo se analizaron el tiempo de exposición, la concentración de AFB₁ y la interacción entre ambos factores. Como efectos aleatorios se analizaron los bloques que incluían todos los tratamientos. Las peceras (unidad experimental) fueron anexadas dentro del bloque. Se agregaron estructuras de correlación y de varianza siguiendo la estrategia de Zuur (Williams 2009, Zuur et al. 2009), hasta obtener un modelo en cuyos residuales no evidencien violación de los supuestos y modelen de manera más eficiente la posible falta de independencia entre medidas repetidas dentro de la unidad experimental. La

selección del mejor modelo para cada análisis se realizó partir del estudio de medidas de bondad de ajuste AIC.

Resultados

Efectos letales de AFB₁ en el alimento para el Pacú

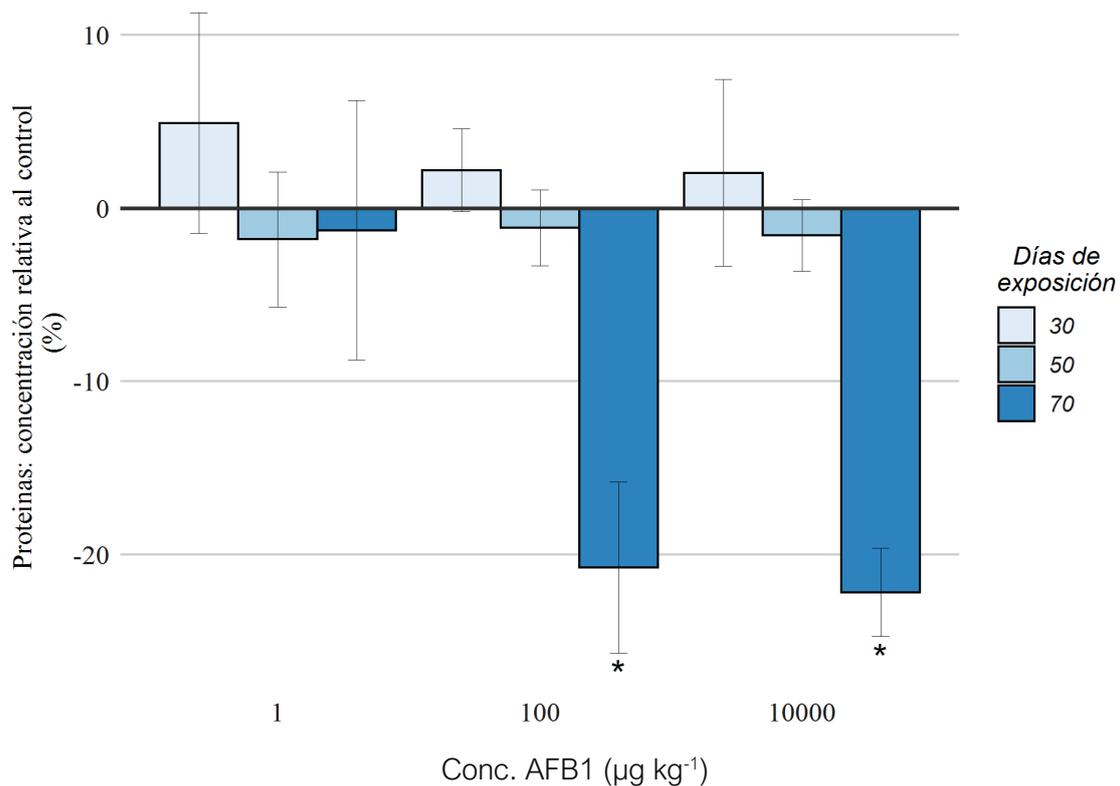
Se evaluó la supervivencia tanto durante los Ensayo 2 (ensayo agudo) como durante el Ensayo 3 (ensayo crónico). En ambos ensayos no se registraron peces muertos en ningún tratamiento por lo que la supervivencia fue 100% en todos los tratamientos evaluados. La duración tradicional de una exposición aguda en las pruebas de ecotoxicidad suele ser de 96 horas (7 días) (Newman 2015), debido a que no se detectó letalidad en este periodo, se extendió este tiempo a 14 días exposición, en los cuales no se detectó letalidad. Por lo tanto, no fue posible estimar mediante los ensayos realizados, una dosis letal para para la especie durante 14 días de exposición, en un intervalo de concentraciones entre 1 y 100000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Evaluación de hepatotoxicidad en juveniles de pacú expuestos a concentraciones subletales AFB₁

En esta sección se muestran los resultados de diferentes respuestas de hepatotoxicidad evaluadas sobre los hígados de los pacues expuestos a 0, 1, 100 y 10.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ en el alimento durante 30, 50 y 70 días. Para el análisis estadístico de la actividad de las enzimas hepáticas, se utilizó un modelo lineal anidado de efectos mixto, en el cual: tiempo de exposición, concentración de AFB₁ e interacción entre ambos factores fueron los efectos fijos. El análisis histopatológico fue realizado, mediante la confección de un índice donde se evaluaron indicadores de daño hepático.

Proteínas hepáticas

Los resultados del análisis de la concentración de proteínas hepáticas se muestran en la Figura 3. 3. y los valores se resumen en la Tabla 3. 9. del Anexo Tablas. Se observó un efecto significativo entre la interacción de la concentración de AFB₁ en el alimento suministrado y el tiempo de exposición sobre concentración de proteínas hepáticas (ANOVA $p=0,0005$). Las comparaciones a posteriori (Prueba de Tukey $p>0,05$) mostraron que la concentración de proteínas hepáticas a 70 días de exposición se redujo significativamente en los peces que consumieron alimento con concentraciones de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB₁, diferenciándose claramente del resto de los tratamientos.



Columnas indican el valor medio de la actividad relativa al control, barras de error indican el error estándar de la media,

**indica diferencias significativas con el control correspondiente. (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).*

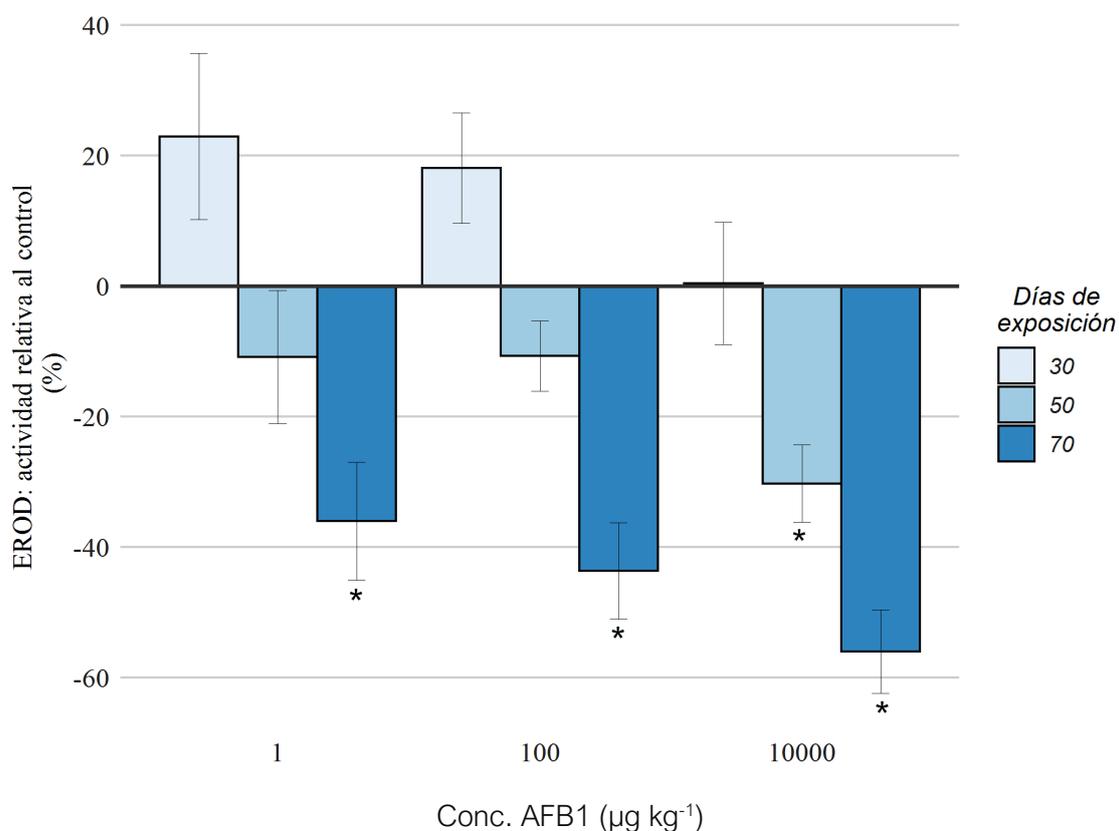
FIGURA 3.3. VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS HEPÁTICAS TOTALES FRENTE A EXPOSICIONES CRÓNICAS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

Enzimas de biotransformación de Fase 1

En esta sección se muestran los resultados de las actividades de las enzimas del sistema de biotransformación de Fase 1, EROD y BROD.

EROD

Los resultados del análisis de la actividad EROD en el hígado se muestran en la Figura 3.4. y en la Tabla 3. 10 del Anexo Tablas. Se observó un efecto significativo entre la interacción de la concentración de AFB₁ en el alimento suministrado y el tiempo de exposición sobre la actividad de la enzima (ANOVA; $p=0,025$). En particular, se observó una leve inducción en la actividad de la enzima a 30 días de exposición para concentraciones bajas de toxina (1 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$), sin embargo, a altas concentraciones de toxina (10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) el efecto desaparece. A 50 y 70 días de exposición se observó una disminución significativa de la actividad de la enzima en función del aumento de la concentración de toxina, este efecto fue proporcionalmente mayor con el incremento de concentración de toxina en el alimento y el tiempo de exposición, diferenciándose claramente la inhibición de la actividad enzimática en los peces expuestos durante 70 días del resto de los tratamientos. Las comparaciones a posteriori (Prueba de Tukey $p>0,05$), indicaron que la actividad EROD a los 70 días de exposición se redujo significativamente en los peces que consumieron alimento con AFB₁ para todas las concentraciones ensayadas. En los peces expuestos durante 50 días, la reducción de la actividad de la enzima fue significativa sólo en los peces alimentados 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, aunque esta tendencia ya puede observarse también en los alimentados con 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁.



Columnas indican el valor medio de la actividad relativa al control, barras de error indican el error estándar de la media,

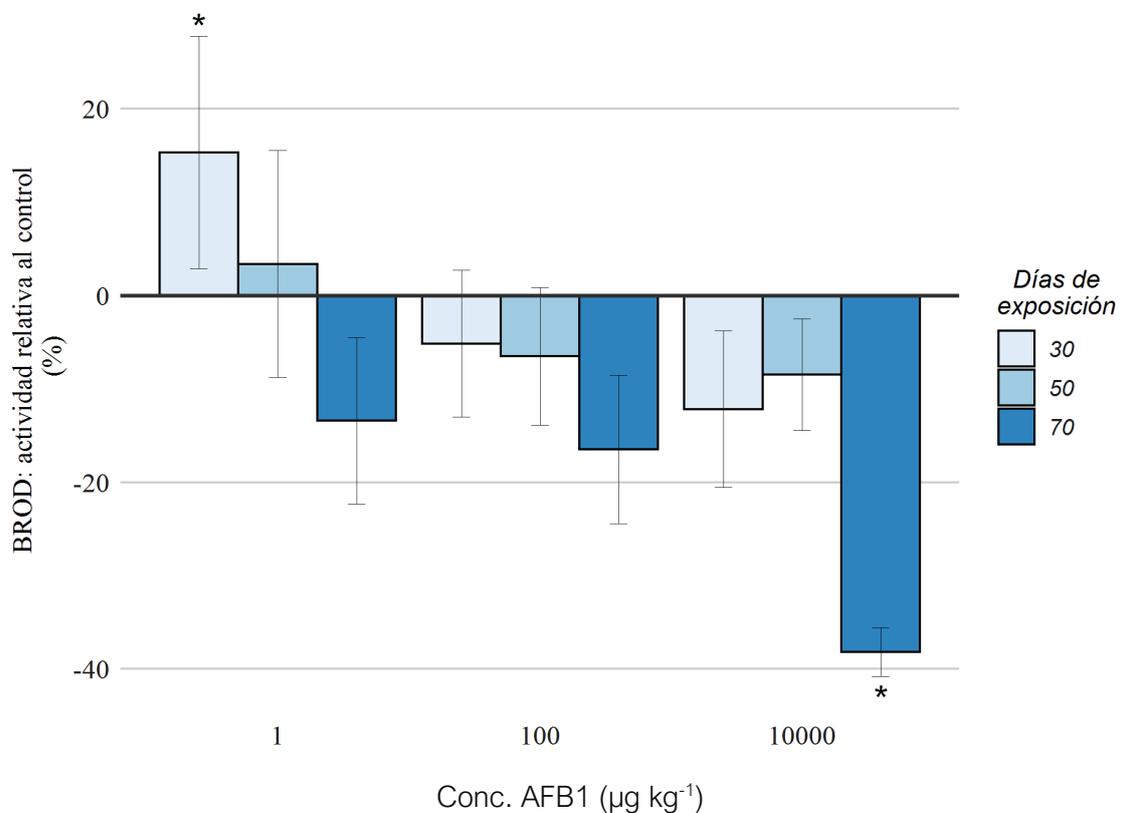
*indica diferencias significativas con el control correspondiente (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

FIGURA 3.4. VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD EROD EN EL HÍGADO DE PACÚ FRENTE A EXPOSICIONES CRÓNICAS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

BROD

Los resultados del análisis de la actividad BROD en el hígado se muestran en la Figura 3.5. y en la Tabla 3.11 del Anexo Tablas. Se observó un efecto significativo entre la interacción de la concentración de AFB₁ en el alimento suministrado y el tiempo de exposición sobre la actividad de la enzima (ANOVA $p=0,0004$). En particular, se observó una inducción en la actividad de la enzima a los 30 días de exposición a la concentración más baja de toxina (1 µg kg⁻¹). A tiempos de exposición más prolongados se observa una disminución en la actividad, detectándose niveles similares al control a los 50 días de exposición, y una marcada inhibición

de la actividad a 70 días de exposición. A concentraciones más elevadas (100 y 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$), se observó una disminución en la actividad de la enzima. Este efecto fue proporcionalmente mayor con el incremento de concentración de toxina en el alimento y el tiempo de exposición. Las comparaciones a posteriori (Prueba de Tukey $p > 0,05$), indicaron que la actividad de BROD aumenta significativamente a bajas concentraciones y periodos cortos de exposición a AFB₁ (1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ durante 30 d) y que a los 70 d de exposición y altas concentraciones de AFB₁ (10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) la actividad se redujo significativamente.



Columnas indican el valor medio de la actividad relativa al control, barras de error indican el error estándar de la media,

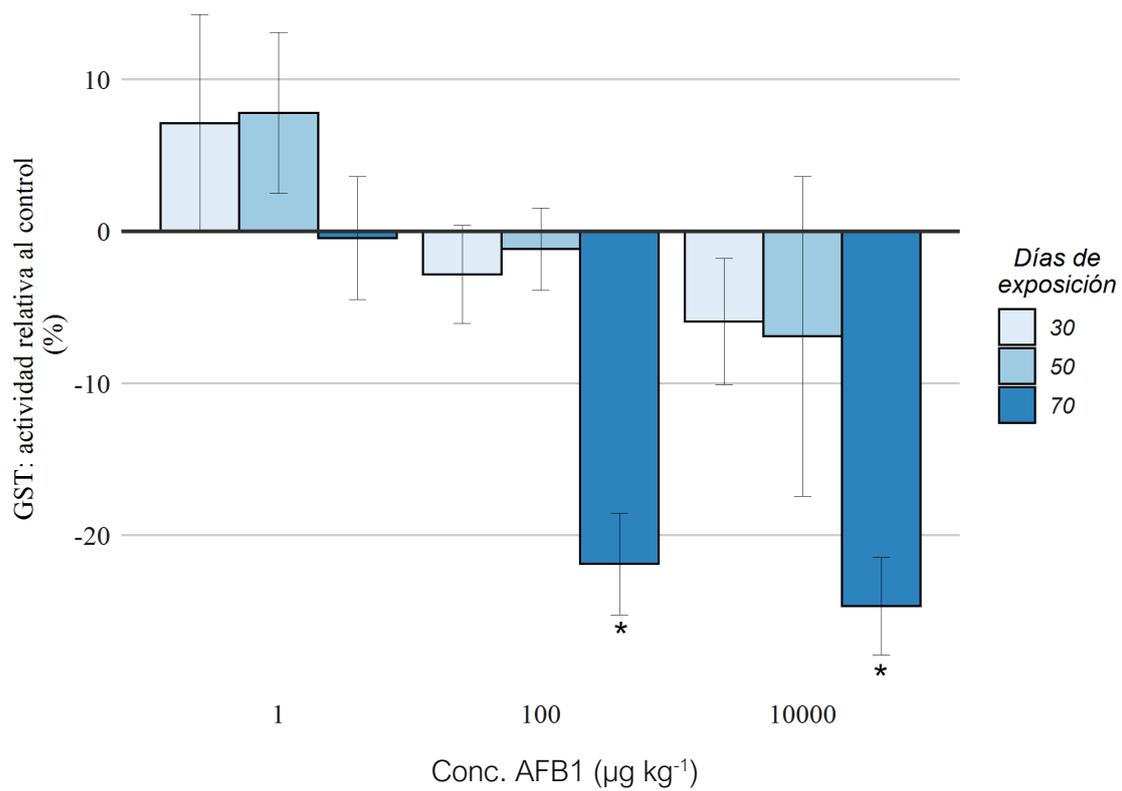
* indica diferencias significativas con el control correspondiente. (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

FIGURA 3.5 VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD BROD EN EL HÍGADO DE PACÚ FRENTE A EXPOSICIONES CRÓNICAS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

Enzimas Fase 2

GST

Los resultados del análisis de la actividad GST en el hígado se muestran en la Figura 3.6. y en la Tabla 3.12 del Anexo Tablas. Se observó un efecto significativo entre la interacción de la concentración de AFB₁ en el alimento suministrado y el tiempo de exposición sobre la actividad de la enzima (ANOVA $p=0,0011$). En particular, se observó que la respuesta de la enzima GST presentó un incremento en la actividad en la concentración más baja esnsayada ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$) a los 30 y 50 d de exposición, detectándose niveles similares al control a los 70 d de exposición para esta concentración. A concentraciones mayores, este efecto no fue detectado y se observó que la actividad de la enzima se encontraba inhibida respecto al control a concentraciones de exposición de 100 y 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Las comparaciones a posteriori (Prueba de Tukey $p>0,05$), indicaron que la actividad de la enzima GST se redujo significativamente a los 70 días de exposición a altas concentraciones de AFB₁ (100 y 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y, aunque se observa un incremento a baja concentración ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$) a los 50 y 70 días de exposición, los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos mediante el modelo analizado.



Columnas indican el valor medio de la actividad relativa al control, barras de error indican el error estándar de la media,

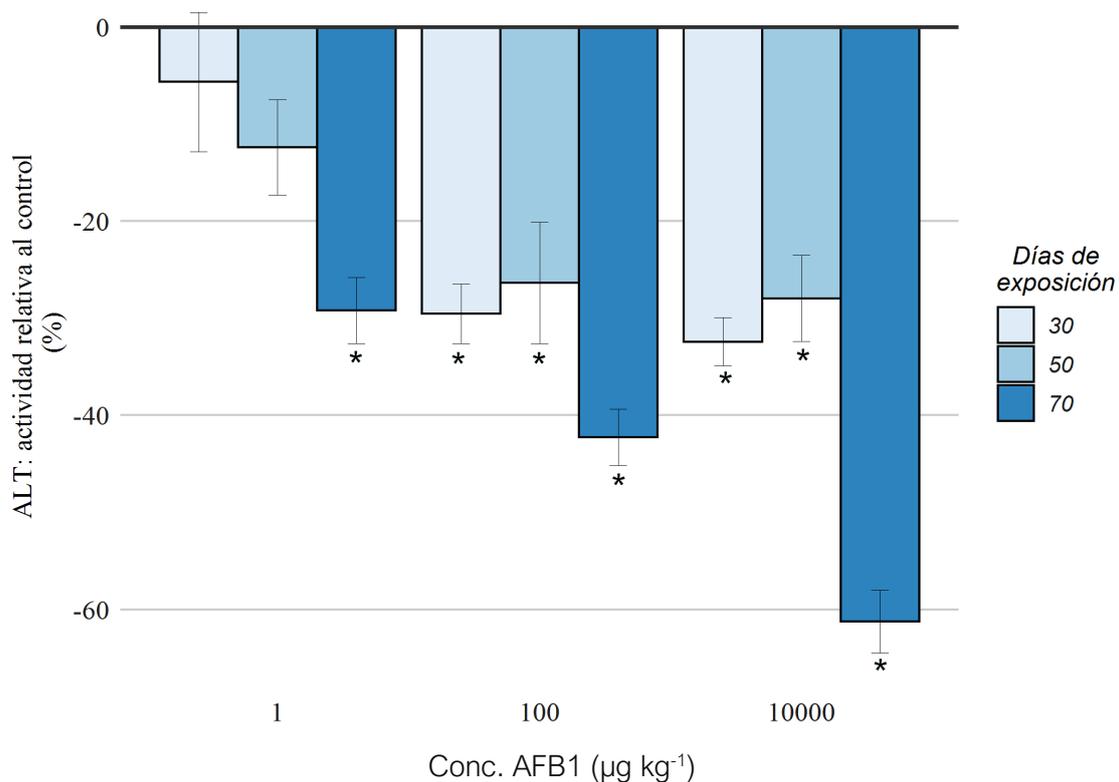
* indica diferencias significativas con el control correspondiente. (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

FIGURA 3.6. VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD GST EN EL HÍGADO DE PACÚ FRENTE A EXPOSICIONES CRÓNICAS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁

Enzimas Indicadoras de daño hepático y NAFD

ALT

Los resultados del análisis de la actividad ALT en el hígado se muestran en la Figura 3. 7. y en la Tabla 3. 13 del Anexo Tablas. Se observó un efecto significativo de la concentración de AFB₁ en el alimento suministrado y la interacción con el tiempo de exposición sobre la actividad de la enzima (ANOVA; $p < 0,0001$). En particular, observó una disminución de la actividad de la enzima ALT en función del aumento de la concentración de toxina, para todos los tiempos evaluados. Este efecto fue proporcionalmente mayor con el incremento de concentración de toxina en el alimento y el tiempo de exposición, diferenciándose claramente la inhibición de la actividad enzimática en los peces expuestos durante 70 días del resto de los tratamientos. Las comparaciones a posteriori (Prueba de Tukey $p > 0,05$) indicaron que la actividad ALT a los 70 días de exposición se redujo significativamente en los peces que consumieron alimento con todas las concentraciones ensayadas de AFB₁. En los peces expuestos durante 30 y 50 días, la reducción de la actividad de la enzima fue significativa en los peces alimentados con 100 y 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, aunque esta tendencia ya puede observarse también en los alimentados con 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁. Para el análisis estadístico, el valor de actividad de la enzima fue previamente transformado mediante la utilización de un logaritmo neperiano, a fin de cumplir con los supuestos del modelo mixto planteado.



Columnas indican el valor medio de la actividad relativa al control, barras de error indican el error estándar de la media,

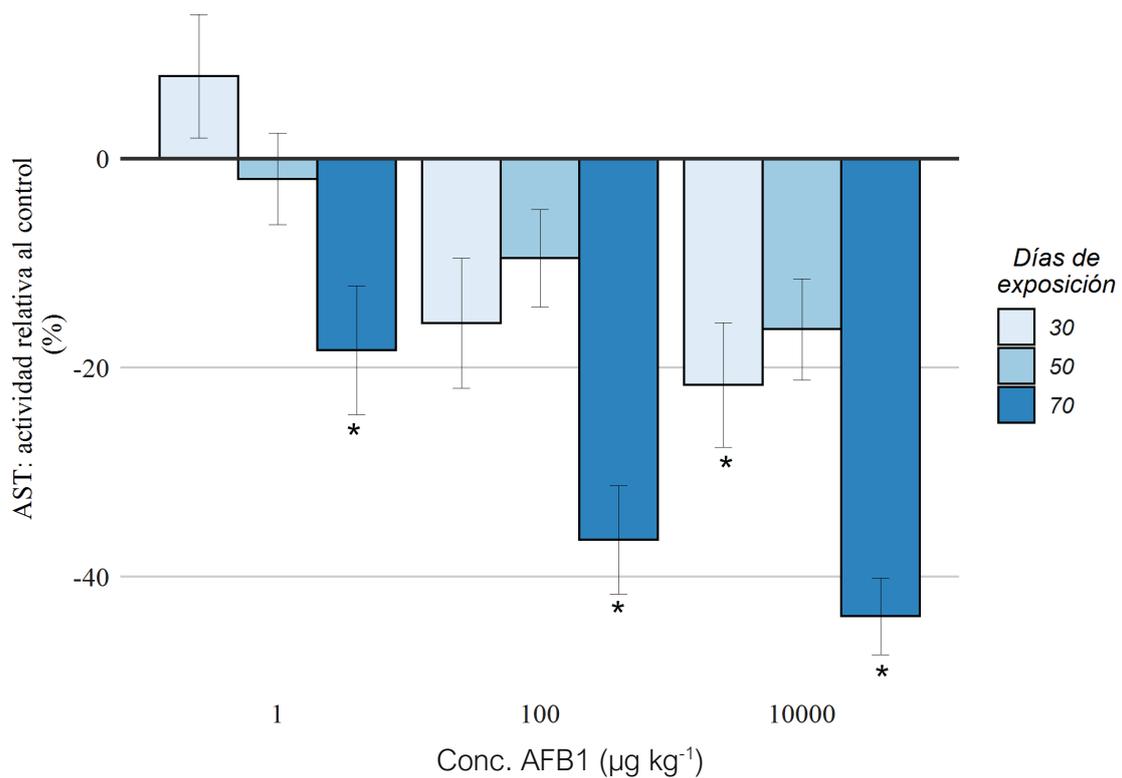
* indica diferencias significativas con el control correspondiente. (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

FIGURA 3.7 VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALT EN EL HÍGADO DE PACÚ FRENTE A EXPOSICIONES CRÓNICAS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

AST

Los resultados del análisis de la actividad AST en el hígado se muestran en la Figura 3.8. y en la Tabla 3.14 del Anexo Tablas. Se observó un efecto significativo entre la interacción de la concentración de AFB₁ en el alimento suministrado y el tiempo de exposición sobre la actividad de la enzima (ANOVA $p < 0,0001$). Particularmente, se observó una disminución de la actividad de la enzima en función del aumento de la concentración de toxina, para todos los tiempos evaluados, manteniéndose la relación de para los 3 tiempos. Las comparaciones a posteriori (Prueba de Tukey $p > 0,05$), indicaron que la actividad AST se redujo significativamente en los peces que consumieron alimento por tiempos de exposición

prolongados (70 días) en todas las concentraciones evaluadas. También se observa una reducción significativa en la actividad de la enzima para los peces expuestos a 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ durante 30 días. El resto de los tratamientos evaluados, no presentan valores significativos con el modelo planteado, pero presentan una tendencia en la inhibición de la enzima.



Columnas indican el valor medio de la actividad relativa al control, barras de error indican el error estándar de la media

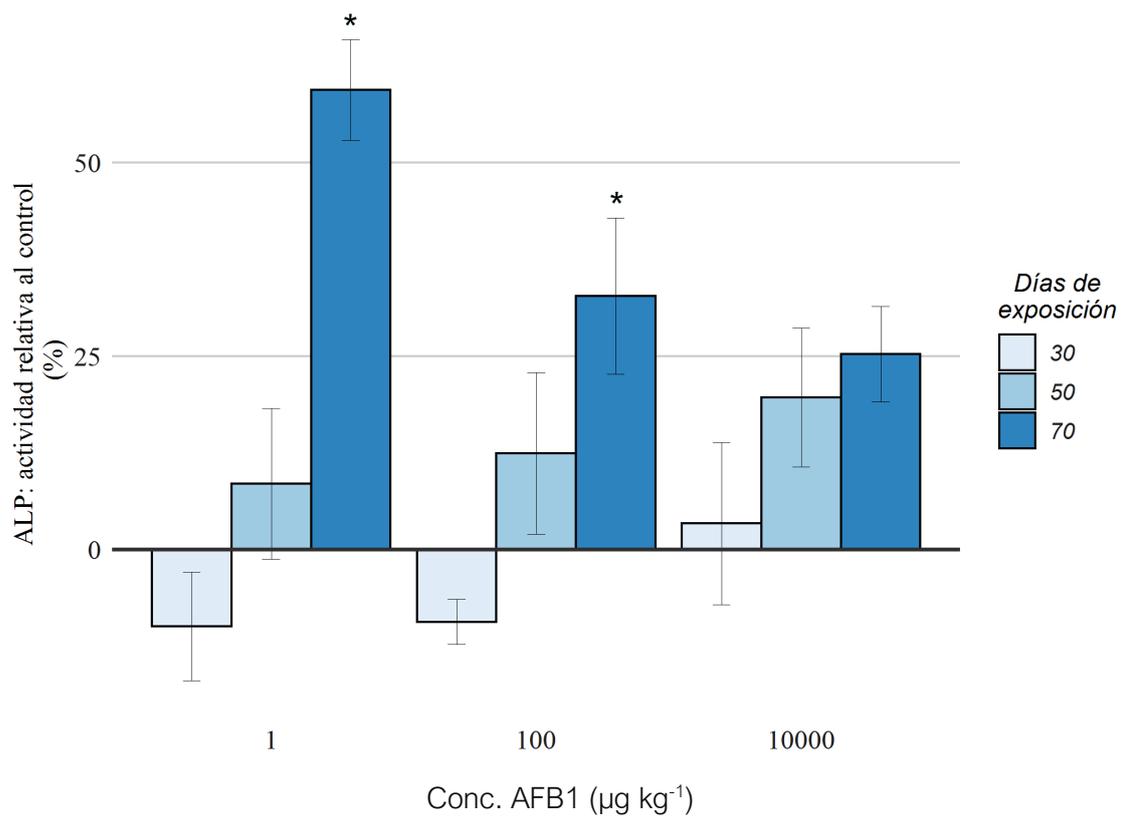
**indica diferencias significativas con el control correspondiente. (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).*

FIGURA 3.8. VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD AST EN EL HÍGADO DE PACÚ FRENTE A EXPOSICIONES CRÓNICAS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

ALP

Los resultados del análisis de la actividad ALP en el hígado se muestran en la Figura 3. 9. y en la Tabla 3. 15 del Anexo Tablas. Se observó un efecto significativo entre la interacción

de la concentración de AFB₁ en el alimento suministrado y el tiempo de exposición sobre la actividad de la enzima (ANOVA; $p < 0,0120$). Particularmente, se observó una disminución de la actividad de la enzima que se mantiene en niveles de actividades constantes, similares al control o un poco inferior a este, para todas las concentraciones ensayadas durante los primeros 30 días de exposición. Luego, a los 50 días de exposición se observó un incremento en la actividad que aumentó proporcionalmente con la concentración de exposición. A los 70 días de exposición a la concentración más baja ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$) se observa una actividad máxima de la enzima que luego disminuye paulatinamente en función del incremento de la concentración de exposición. Las comparaciones a posteriori (Prueba de Tukey $p > 0,05$) indicaron que la actividad ALP a los 70 días de exposición se incrementó significativamente en los peces que consumieron alimento con 1 y $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁. En los peces expuestos durante 50 días, el incremento de la actividad de la enzima no fue significativa en los peces alimentados con AFB₁, aunque puede observarse una tendencia en el incremento de la actividad de la enzima.



Columnas indican el valor medio de la actividad relativa al control, barras de error indican el error estándar de la media

* indica diferencias significativas con el control correspondiente. (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

FIGURA 3.9. VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALP EN EL HÍGADO DE PACÚ FRENTE A EXPOSICIONES CRÓNICAS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

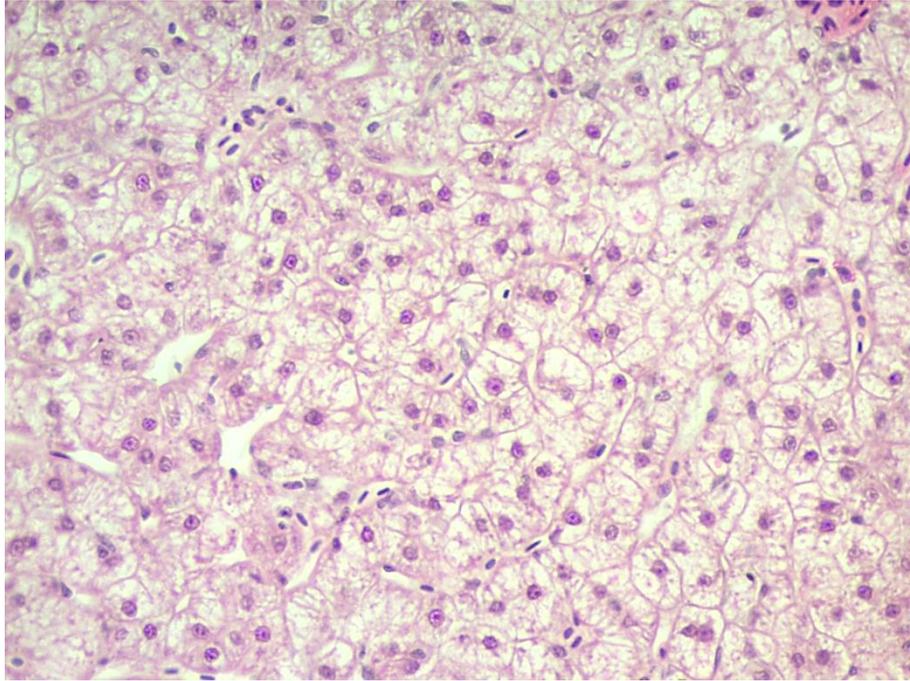
Análisis del daño histopatológico

Los resultados del análisis de los cortes histológicos observados en el microscopio óptico se presentan en las Tablas 3.4. y 3.5. en las cuales se muestran los valores de puntuación histológica que permitan observar daño hepático. En la evaluación a nivel histológico, se observó que la esteatosis prevalece en periodos cortos de exposición y la inflamación es detectada a altas concentraciones de exposición a la toxina. Los fenómenos de balonización se explicaron mejor a la interacción entre la concentración de AFB₁ y el tiempo de exposición.

Un hígado normal (Figura 3.10), se caracterizó como una estructura uniforme donde se observó ausencia de espacios circulares vacíos en el citoplasma de los hepatocitos (esteatosis), no se detectaron focos de presencia de leucocitos polimorfonucleares (inflamación) y no se observaron incrementos del tamaño de los hepatocitos o la presencia de tejido conectivo (balonización y/o fibrosis celular). Los hígados que presentaron signos de esteatosis lo hicieron en niveles considerados de grado 1 (Figura 3. 11) y grado 2 (Figura 3. 12), de acuerdo con los valores asignados en la Tabla 3. 4. Se detectaron signos de lesión hepatocelular en los hígados de los peces expuestos a AFB₁ en forma de: balonización hepatocelular y/o fibrosis celular. La severidad de estas lesiones se incrementó con el tiempo de exposición a concentraciones de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, pero no fueron observables a concentraciones de 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para ningún tiempo de exposición ensayado. De acuerdo con la escala asignada, se detectaron niveles de balonización hepatocelular y/o fibrosis celular, grado 1 (Figura 3. 14) y grado 2 (Figuras 3. 15 y 3. 16). A su vez, algunos de los hepatocitos balonizados estuvieron acompañados de cuerpos hialinos de Mallory-Denk (Figuras 3. 11 y 3. 16). A la más alta concentración de exposición ensayado y periodos prolongados de exposición (10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 70 d), se observó necrosis hepatocelular con liberación de hierro en forma de hemosiderina (Figura 3. 14). Este pigmento también se visualizó en algunas muestras de peces expuestos a concentraciones de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 3.

13). La inflamación fue observada a concentraciones de exposición de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $10000 \mu\text{g kg}^{-1}$ en las muestras de los peces expuestos a AFB₁ por 50 y 70 días (Figura 3.14). Mientras que el Grado 2 prevaleció a tiempos intermedio de exposición (50 días), a tiempos de exposición prolongados (70 días) prevaleció el Grado 3 de inflamación.

El índice histopatológico diseñado, indicó que el grado de severidad de la esteatosis es más evidente durante los primeros 30 días de exposición, para luego disminuir su intensidad o ser imperceptible al microscopio óptico con la técnica utilizada. A diferencia de esta respuesta, los otros parámetros evaluados (inflamación y balonización) incrementaron su severidad con la concentración y/o el tiempo de exposición. Como se observa en la Tabla 3. 5, el índice histopatológico propuesto varía en función de la concentración de exposición, mientras que, a distintos tiempos de exposición e igual concentración, la diferencia entre los grupos depende de la concentración evaluada.



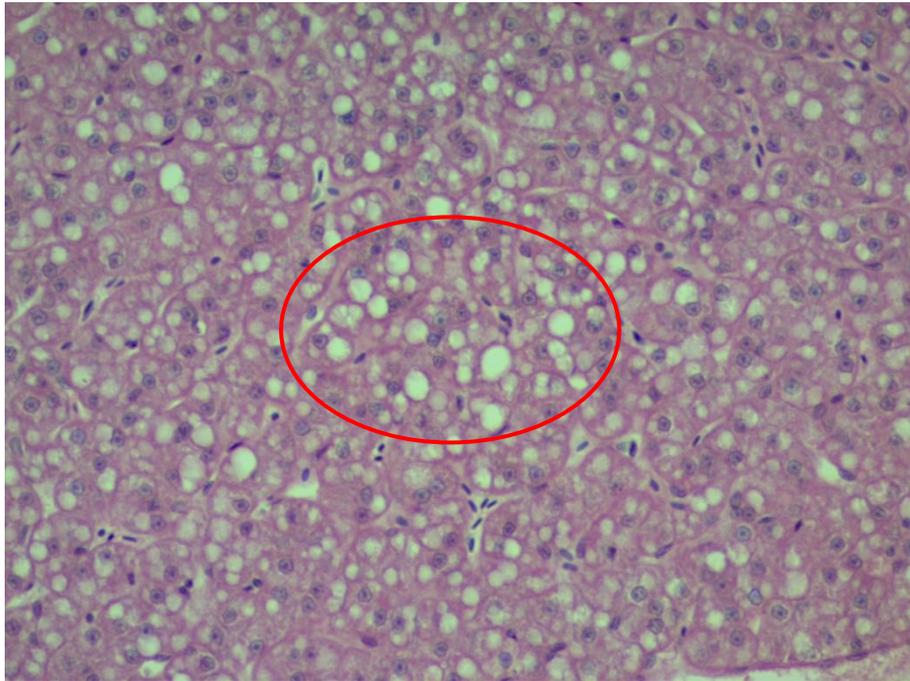
Es característica la ausencia de espacios circulares vacíos en el citoplasma de los hepatocitos (esteatosis- Grado 0), no se detectan focos de presencia del polimorfonuclear (inflamación- Grado 0), no se observa incremento del tamaño de los hepatocitos o la presencia de tejido conectivo (Balonización y/o fibrosis celular -Grado 0). Observación al microscopio óptico (40x). Tinción hematoxilina-eosina

FIGURA 3.10. CORTE HISTOLÓGICO HÍGADO DE PACÚ ALIMENTADO CON DIETA LIBRE DE AFB₁, HÍGADO SIN DAÑOS APARENTES.



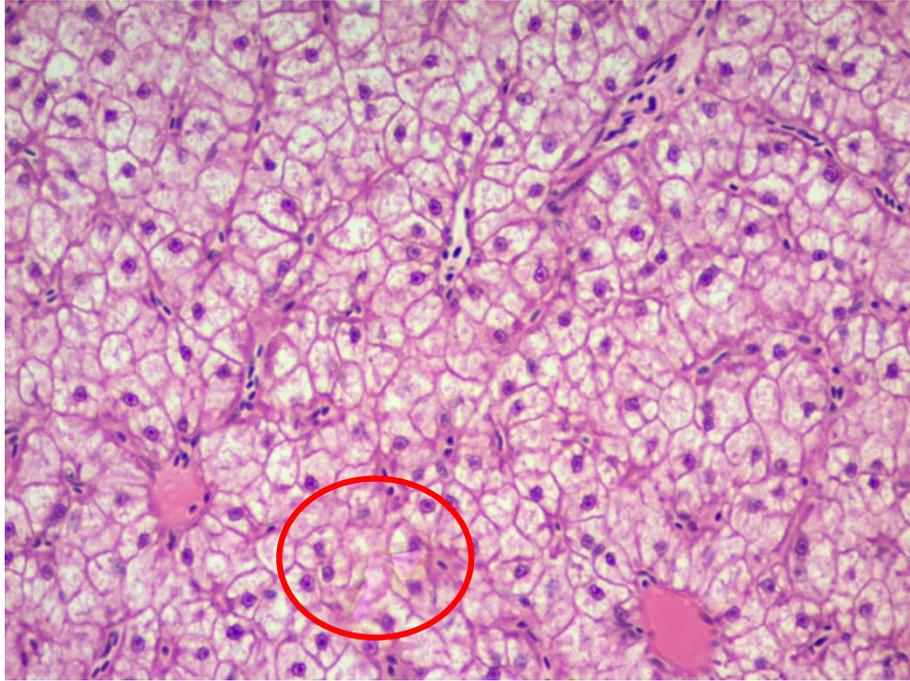
Se caracteriza por la presencia de espacios circulares vacíos en el citoplasma de los hepatocitos (esteatosis- Grado 1-Circulos Rojos) y la presencia ocasional de Cuerpos de Mallory-Denk (Flecha negra). Observación al microscopio óptico (40x). Tinción hematoxilina-eosina

FIGURA 3.11. CORTE HISTOLÓGICO HÍGADO DE PACÚ EXPUESTO ALIMENTACIÓN CON PRESENCIA DE AFB₁. HÍGADO CON PRESENCIA DE ESTEATOSIS GRADO 1.



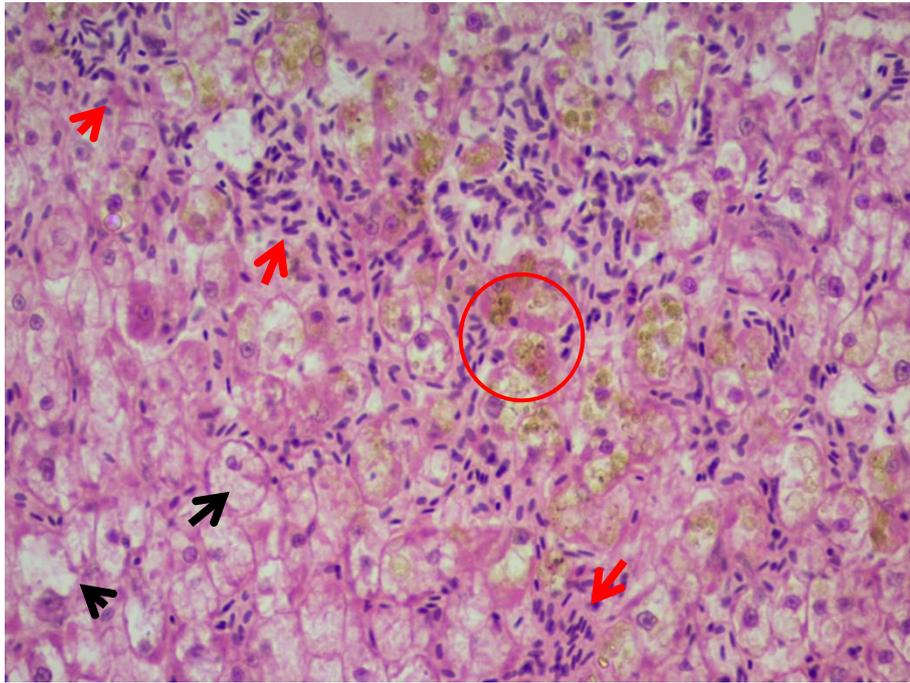
Se caracteriza la evidencia de esteatosis hepática, dada por la presencia de vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos y el núcleo desplazado- Círculos Rojos (Esteatosis-Grado 2). Observación al microscopio óptico (40x). Tinción hematoxilina-eosina

FIGURA 3.12. CORTE HISTOLÓGICO HÍGADO DE PACÚ EXPUESTO ALIMENTACIÓN CON PRESENCIA DE AFB₁. HÍGADO CON PRESENCIA DE ESTEATOSIS GRADO 2.



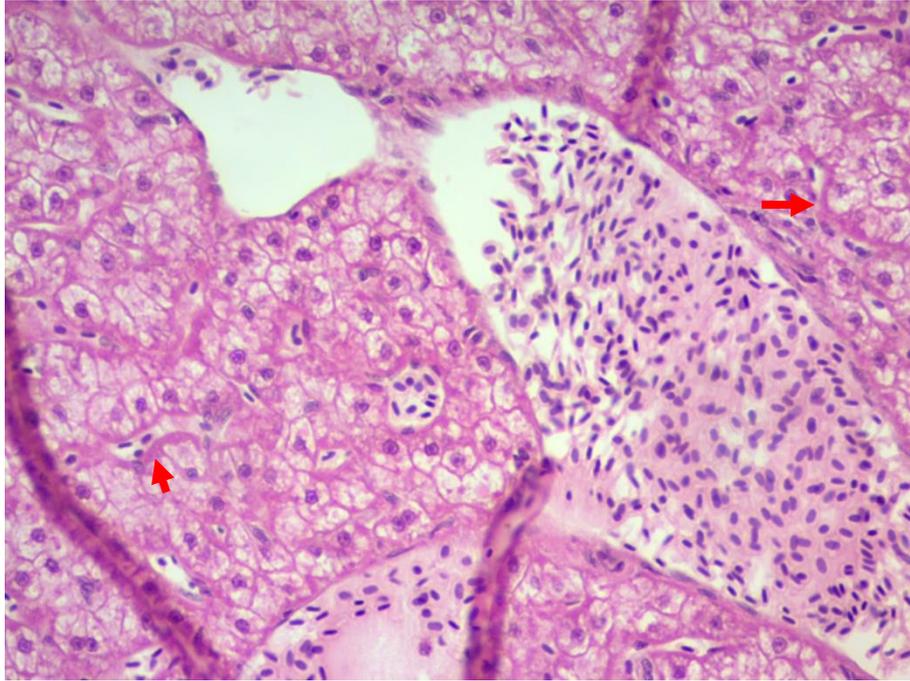
*Se caracteriza por la presencia de necrosis hepatocelular con liberación de hierro (hemosiderina).
Observación al microscopio óptico (40x). Tinción hematoxilina-eosina*

FIGURA 3.13. CORTE HISTOLÓGICO HÍGADO DE PACÚ EXPUESTO A AFB₁. LEVE NECROSIS
HEPATOCELULAR CON LIBERACIÓN DE HIERRO.



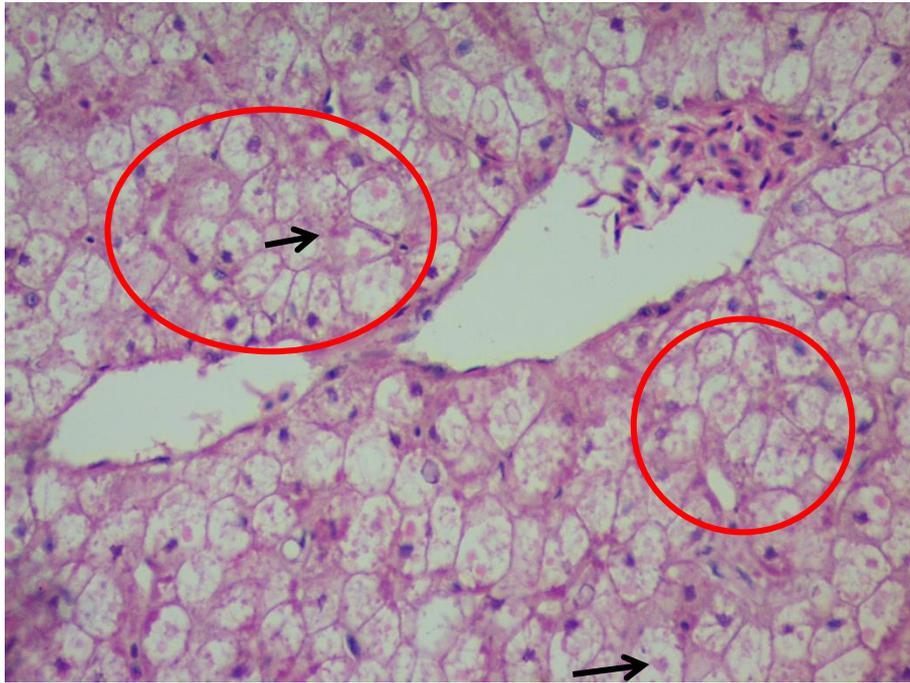
Se caracteriza por la presencia de necrosis hepatocelular (círculos rojos) con liberación de hierro (hemosiderina, agregados micelares de ferritina que sirven de reservorio de hierro). Las flechas negras muestra una leve balonización de hepatocitos (balonización grado 1). Las flechas rojas señalan acúmulo de polimorfonucleares neutrófilos (infiltrado inflamatorio grado 3). Observación al microscopio óptico (40x). Tinción hematoxilina-eosina

FIGURA 3.14. CORTE HISTOLÓGICO HÍGADO DE PACÚ EXPUESTO A AFB₁. NECROSIS HEPATOCELULAR CON LIBERACIÓN DE HIERRO, PRESENCIA DE BALONIZACIÓN DE HEPATOCITOS Y ACÚMULO DE POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS.



Flechas señalan acumulación de colágeno en el espacio intercelular (fibrosis grado 2). Observación al microscopio óptico (40x). Tinción hematoxilina-eosina

FIGURA 3.15. CORTE HISTOLÓGICO HÍGADO DE PACÚ EXPUESTO A AFB₁. ACUMULACIÓN DE COLÁGENO EN EL ESPACIO INTERCELULAR (FIBROSIS GRADO 2).



Círculos señalan balonización de hepatocitos (balonización Grado 2). Se detecta la presencia ocasional de cuerpos de Mallory-Denk (flecha negra). Observación al microscopio óptico (40x). Tinción hematoxilina-eosina.

FIGURA 3.16. CORTE HISTOLÓGICO HÍGADO DE PACÚ EXPUESTO A AFB₁. BALONIZACIÓN DE HEPATOCITOS GRADO 2.

TABLA 3.4. PUNTAJE DEL DAÑO HISTOPATOLÓGICO EN HÍGADO DE PACÚ EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B1 EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Concentración AFB1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en alimento		Grado de severidad (recuento acumulado) a cada tiempo de exposición																		
		Dia 30					Dia 50					Dia 70								
		Grado 0 (ausencia)	Grado 1 (leve)	Grado 2 (moderada)	Grado 3 (grave)	Suma Promedio	Grado 0 (ausencia)	Grado 1 (leve)	Grado 2 (moderada)	Grado 3 (grave)	Suma Promedio	Grado 0 (ausencia)	Grado 1 (leve)	Grado 2 (moderada)	Grado 3 (grave)	Suma Promedio				
<i>Esteatosis</i>		0 (control)	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
		1	1	3	2	0	1,17	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
		100	1	3	2	0	1,17	4	1	1	0	0,5	2	4	0	0	0	0	0,67	
		10000	1	2	3	0	1,33	2	2	2	0	1	2	4	0	0	0	0	0,67	
<i>Balonización</i>		0 (control)	6	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0
		1	6	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0
		100	3	3	0	0,5	4	2	0	0,33	0	0	6	0	0	6	0	0	2	
		10000	0	6	0	1	0	0	6	2	0	0	6	0	0	6	0	0	2	
<i>Inflamación</i>		0 (control)	6	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0
		1	6	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0
		100	6	0	0	0	0	4	0	2	0	0,67	5	0	1	0	0	0,33		
		10000	6	0	0	0	0	0	0	6	0	2	0	0	0	6	0	0	3	

Barras azules indican cantidad de muestras identificadas para cada ítem evaluado, sobre un total de 6 en cada concentración de AFB₁/Tiempo de exposición.
Suma promedio: Valor promedio para cada tratamiento del índice correspondiente.

TABLA 3.5. ÍNDICE DEL DAÑO HISTOPATOLÓGICO EN HÍGADO DE PACÚ

	Día 30	Día 50	Día 70
0 (control)	0,00	0,00	0,00
1	1,17	0,00	0,00
100	1,67	1,50	3,00
10000	2,33	5,00	5,67

Suma de promedios de los parámetros evaluados por tratamiento, según índice Tabla 3.1.

Efectos de AFB₁ sobre parámetros de desempeño biológico, índices de desempeño productivo, condición y calidad de carnes en estadios tempranos de producción

En esta sección se muestran los resultados que se obtuvieron de los análisis de desempeño biológico de interés para la producción realizados sobre pacúes expuestos a 0, 1, 100 y 10000 µg kg⁻¹ de AFB₁ en el alimento por periodos de 30, 50 y 70 d. Los parámetros evaluados fueron: el índice de condición K, la tasa de crecimiento específico (SGR) y el índice hepatosomático (HSI)

Índice de condición (K)

Los resultados del análisis del índice de condición (K) se muestran en la Tabla 3.6. No se observó un efecto significativo ($p=0,05$) entre los tratamientos para la concentración de AFB₁ en el alimento suministrado y los tiempos de exposición evaluados (ANOVA $p_{conc}= 0,846$; $p_{tiempo\ exp}= 0,213$; $p_{conc\tiempo\ exp}= 0,799$).

TABLA 3.6. ÍNDICE DE CONDICIÓN (K) EN PACÚ, EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B1 EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Ensayo 3

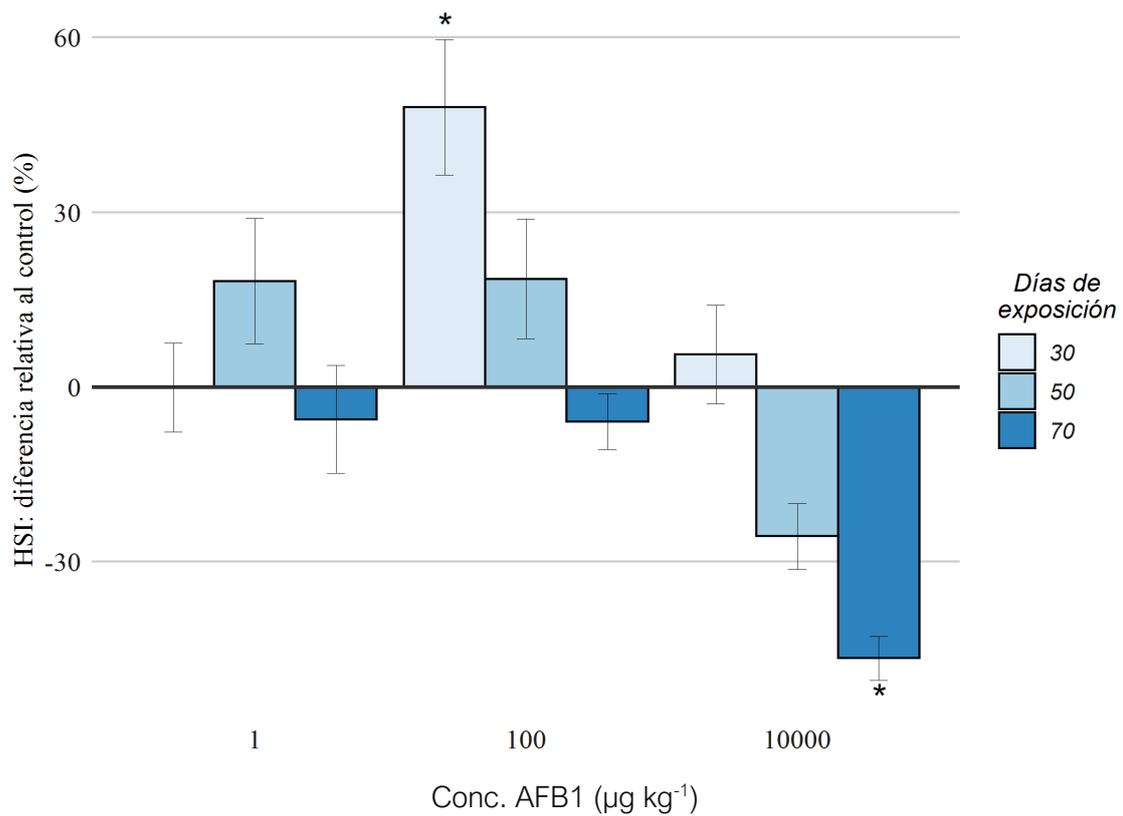
Concentración AFB ₁ (µg kg ⁻¹) en alimento	índice de condición (K)		
	Tiempo de Exposición		
	Día 30	Día 50	Día 70
0 (control)	3,6±0,3 a	3,7±0,5 a	3,8±0,2 a
1	3,6±0,4 a	3,8±0,4 a	3,5±0,4 a
100	3,6±0,2 a	3,8±0,4 a	3,7±0,3 a
10000	3,5±0,2 a	3,6±0,7 a	3,7±0,3 a

Valores expresados como promedios±desviación estándar (n=9).

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, prueba de Tukey ($p < 0,05$)

Índice Hepatosomático (HSI)

Los resultados del análisis del HSI se muestran Tabla 3.16 del Anexo Tablas y en la Figura 3.17. Se observó un efecto significativo entre la concentración de AFB₁ en el alimento suministrado y la interacción con el tiempo de exposición sobre índice hepatosomático (ANOVA $p=0,0007$). En particular, se observó un incremento en el peso del hígado reflejado en el valor de HSI para los peces que estuvieron expuestos a 100 y 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ durante 30 días, y a 1 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ durante 50 días respecto a los controles, en cada tiempo de exposición. A los 70 días de tratamiento, los hígados de los peces que estuvieron expuestos a AFB₁ disminuyeron en peso y se observó una disminución del valor de HSI. Un efecto similar se detectó para los peces que estuvieron expuestos a 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ durante 50 días. Las comparaciones a posteriori (Prueba de Tukey $p>0,05$) indicaron que el HSI aumento significativamente durante los primeros 30 días de exposición en los peces que consumieron 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, que se redujo significativamente el HSI en los peces que consumieron alimento por tiempos de exposición prolongados (70 días) a altas concentraciones de AFB₁ (10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$), y que el resto de los tratamientos evaluados a 70 días de exposición no presentan diferencias significativos con el modelo planteado, pero presentan una tendencia en la reducción del HSI.



Columnas indican el valor medio de la actividad relativa al control, barras de error indican el error estándar de la media,

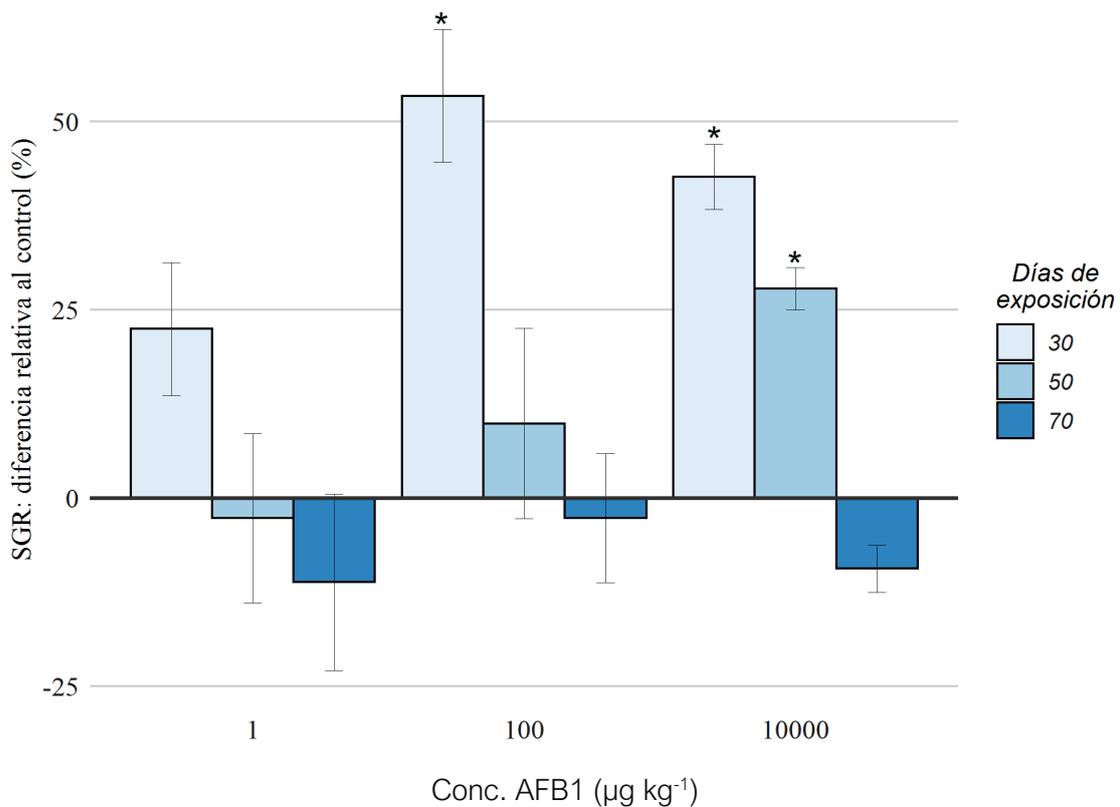
*indica diferencias significativas con el control correspondiente. (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

FIGURA 3.17. VARIACIÓN DEL ÍNDICE HEPATOSOMÁTICO EN PACÚ FRENTE A EXPOSICIONES CRÓNICAS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁

Tasa de crecimiento específica (SGR)

Los resultados del análisis de la tasa de crecimiento específico evaluada como SGR se muestran en la Tabla 3.17 del Anexo Tablas y la Figura 3.18. Se observó un efecto significativo de la concentración de AFB₁ en el alimento suministrado y la interacción con el tiempo de exposición sobre la tasa de crecimiento específica (ANOVA $p = 0,0433$). En particular, se observó un incremento del SGR, a tiempos cortos de exposición (30 días), el mismo efecto se detectó en las concentraciones de 100 y 10000 µg kg⁻¹ a 50 días de exposición. A 70 días de exposición se observa que el SGR disminuye para todas las concentraciones evaluadas,

indicando que la toxina podría producir un efecto anabólico en un primer momento, que luego se ve contrarrestado debido al daño hepático. Las comparaciones a posteriori (Prueba de Tukey $p > 0,05$) indicaron que el SGR aumento significativamente durante los primeros 30 días de exposición en los peces que consumieron 100 y 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ y que a 50 días de exposición los peces expuestos a altas concentraciones de AFB₁ (10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) presentaron un aumento significativo en el SGR.



Columnas indican el valor medio de la actividad relativa al control, barras de error indican el error estándar de la media,

*indica diferencias significativas con el control correspondiente. (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

FIGURA 3.18. VARIACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO ESPECÍFICO EN PACÚ FRENTE A EXPOSICIONES CRÓNICAS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

Relación longitud/peso

Los resultados del análisis de los coeficientes de la ecuación 3.5, que describen la relación longitud/peso se muestran en Tabla 3.7. Según estos resultados y el patrón observado

en la Figura 3.19, los valores obtenidos no indicarían variación por el consumo de AFB₁. Se observó que los peces expuestos a AFB₁, presentan un valor del índice b menor a 3 (alométrico negativo), mientras que en los controles en los 3 tiempos de exposición evaluados este valor se encuentra presentan valores superiores a 3 (alométrico positivo). Sin embargo, diferencias no fueron significativas y corresponderían a variaciones normales para la especie.

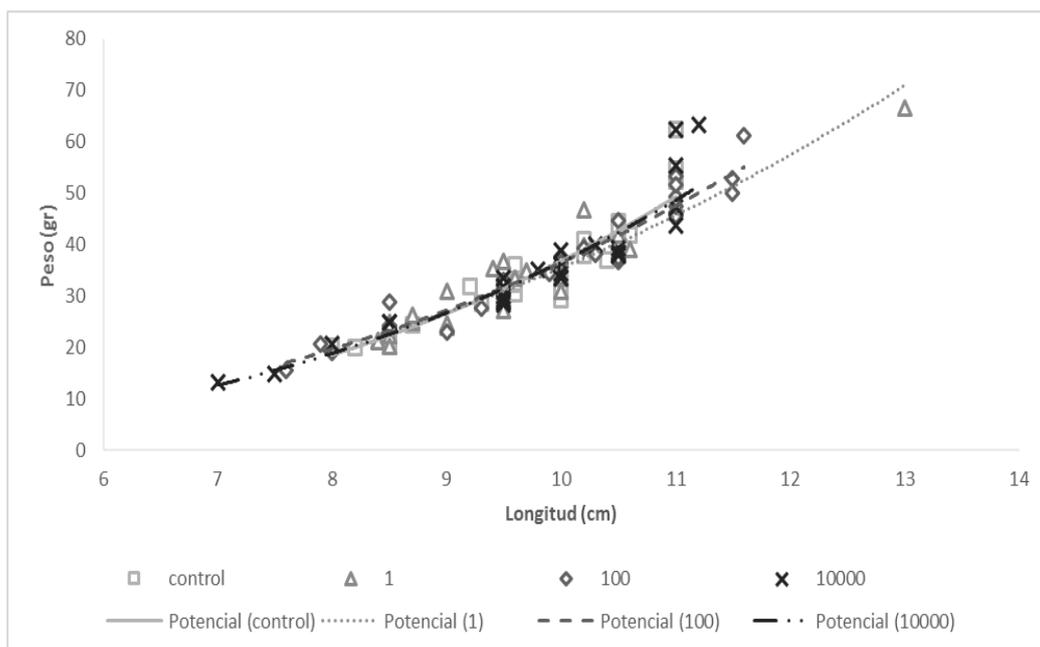
TABLA 3.7. RELACIÓN LONGITUD/PESO EN PACÚ EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B1 EN EL ALIMENTO.

Ensayo 3

*Concentración AFB₁ µg kg⁻¹
en alimento*

	L-W Relación	R ²
0 (control)	$y=0,0315 x^{3,0672}$	0,889
1	$y=0,0813 x^{2,6405}$	0,878
100	$y=0,0614 x^{2,7747}$	0,943
10000	$y=0,0386 x^{2,9771}$	0,928

Ecuación 3.6: $y = a x L$ y = peso en gramos (WT) L = Longitud en cm.



Los valores 1, 100 y 10000, corresponden a 1, 100 y 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 en el alimento suministrado.

FIGURA 3.2. RELACIÓN LONGITUD/PESO EN PACÚ EXPUESTOS A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB_1

Efectos de AFB_1 sobre la calidad de carne (composición centesimal) del pacú

Se evaluó la composición centesimal cada 100 g de porción comestible, del músculo recolectados de los peces del Ensayo 3. Los resultados del análisis de carbohidratos (g), proteína (g), materia grasa (g), contenido de agua (g), cenizas(g), energía (Kcal) se muestran en la Tabla 3.8. Se observó que el contenido de carbohidratos, proteína y cenizas no variaron significativamente con el consumo de AFB_1 en las concentraciones y tiempos evaluados (ANOVA $p > 0,05$). Contrariamente, la materia grasa (ANOVA $p < 0,0001$), contenido de agua (ANOVA $p = 0,0006$) y energía (ANOVA $p < 0,0001$) presentaron efecto significativo para la interacción entre la concentración de AFB_1 en el alimento suministrado y el tiempo de exposición. En particular, se observó un aumento en el contenido de materia grasa en el músculo en proporción a la concentración de AFB_1 en el alimento luego de 50 días de exposición. El contenido de humedad en el músculo presentó una reducción inversamente

proporcional a la concentración de AFB₁ para períodos de exposición prolongada, 50 y 70 días. La energía expresada en kcal fue calculada a partir del contenido de proteína y materia grasa, por lo que se observaron valores correlacionados con los obtenidos en materia grasa donde el valor de energía, aumento en proporción de la concentración de AFB₁ para los peces que estuvieron expuestos durante 50 y 70 días. Las comparaciones a posteriori (Prueba de Tukey $p>0,05$), indicaron que el contenido de materia grasa aumento significativamente para todas las concentraciones evaluadas a los 50 y 70 días de exposición. El contenido de humedad disminuyó significativamente en los peces que consumieron alimento con 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ por tiempos de exposición prolongados (50 y 70 días). La energía aumento significativamente en los peces estuvieron expuestos a 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ durante 50 y 70 días.

TABLA 3.8. COMPOSICIÓN MEDIA PROXIMAL Y MINERAL DE CARNE DE PACÚ EXPUESTO CRÓNICAMENTE A CONCENTRACIONES SUBLETALES AFB₁. VALORES REPORTADOS COMO PROMEDIO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR (N=9) CADA 100 G DE CARNE.

Determinación	Concentración AFB ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$ en alimento	Tiempo de Exposición		
		Día 30	Día 50	Día 70
Carbohidratos (g)				
	o (control)	0,7±0,5	0,5±0,6	0,5±0,6
	1	0,3±0,4	0,6±0,6	0,4±0,5
	100	1,0±1,0	1,0±2,6	0,8±0,8
	10000	0,7±0,8	1,2±1,3	0,8±0,9
Proteína (g)				
	o (control)	22,9±2,2	20,6±1,6	20,1±1,4
	1	21,2±2,4	19,3±1,7	20,2±2,2
	100	20,7±2,6	18,8±1,9	18,3±2,0
	10000	20,8±2,5	20,6±1,9	18,9±0,6
Materia Grasa (g)				
	o (control)	3,5±0,2 ^a	3,6±0,1 ^a	3,5±0,1 ^a
	1	4,7±0,1 ^{bc}	4,9±0,2 ^c	4,6±0,1 ^b
	100	4,4±0,2 ^{bc}	6,5±0,5 ^d	6,5±0,7 ^d
	10000	4,6±0,2 ^{bc}	9,6±0,2 ^e	9,5±0,5 ^e
Contenido de agua (g)				
	o (control)	71,3±2,1 ^{ab}	73,5±1,7 ^b	74,1±1,6 ^b
	1	72,6±2,5 ^{ab}	72,1±1,8 ^{ab}	73,0±2,8 ^b
	100	72,8±1,7 ^b	72,5±3,4 ^{ab}	72,9±2,4 ^b
	10000	72,2±1,9 ^b	67,8±1,7 ^a	69,4±0,8 ^{ab}
Cenizas (g)				
	o (control)	1,7±0,0	2,3±0,1	2,1±0,1
	1	1,8±0,1	3,4±0,2	2,5±0,1
	100	1,5±0,1	1,8±0,1	2,1±0,1
	10000	2,4±0,1	1,4±0,1	1,9±0,1
Energía (Kcal)				
	o (control)	123,0±7,9 ^{ab}	114,6±6,9 ^{ab}	112,3±5,0 ^a
	1	127,3±9,4 ^{ab}	121,1±7,4 ^{ab}	122,2±9,1 ^{ab}
	100	121,9±10,9 ^{ab}	133,4±6,3 ^b	131,3±10,0 ^{ab}
	10000	124,4±11,2 ^{ab}	168,6±9,2 ^c	160,8±5,9 ^c

Letras distintas indican diferencias significativamente entre tratamientos (Prueba de Tukey, $p < 0,05$).
Determinaciones sin letras, no presentaron diferencias significativas.

Discusión

De acuerdo los objetivos plantados en el presente capítulo, aquí se discuten los resultados en torno a los hallazgos más relevantes, estos fueron:

Letalidad de AFB₁ en el alimento para el Pacú

Como se indicó previamente, la susceptibilidad y el metabolismo de los peces a las aflatoxinas varia ampliamente entre las distintas especies (Bedoya-Serna et al. 2018). Teniendo en cuenta que no se observaron efectos letales a concentraciones y tiempos de exposición muy grandes y sumado a la detección de residuos de AFB₁ y AFM₁ en los tejidos, ello indicaría que la especie es muy tolerante a las aflatoxinas. Al momento de realizar los ensayos, no existían estudios publicados que indicaran la sensibilidad de esta especie en relación con efectos letales inducidos por AFB₁. Los resultados obtenidos contrastan con estudios recientemente publicados por Michelin et al. (2021a) para la especie donde se reportaron una mortalidad del 10% para concentraciones de 50 µg kg⁻¹ de AFB₁ en períodos de exposición de 180 días, no informado efectos letales a los tiempos de evaluación intermedios del trabajo 30, 60, 90, 120 y 150 días.

A su vez, los resultados obtenidos contrastan con los informados para especies como la Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*), o la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). En Trucha arcoíris, se ha observado que concentraciones superiores a 250 µg kg⁻¹ de AFB₁ durante 21 días o más causan mortalidad. En tilapia se registró una mortalidad del 45% en los peces expuestos a concentraciones de 10000 µg kg⁻¹ de AFB₁ por 6 semanas. Para la corvina roja el 50% de mortalidad se observó cuando se expusieron los peces durante 7 semanas a concentraciones de entre 100 a 5000 µg kg⁻¹ de AFB₁, sin importar la dosis (Anh Tuan et al. 2002, Santacroce et al. 2007, Nomura et al. 2011, Santacroce et al. 2011, Ayyat et al. 2013, Zychowski et al. 2013, Anater et al. 2016, Oliveira and Vasconcelos 2020).

En la bibliografía también se encontraron reportes de otras especies con niveles de tolerancia semejantes a las encontrados para el pacú. Por ejemplo, el sábalo de cola roja (*Brycon cephalus*) para el que concentraciones de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ durante 180 días no causaron mortalidad (Bedoya-Serna et al. 2018) o el bagre sapo (*Rhamdia quelen*) que tampoco presentó mortalidad cuando se los expuso a concentraciones de AFB₁ de $180 \mu\text{g kg}^{-1}$ durante 56 días (Anater et al. 2020).

Por su parte, en contradicción a lo expuesto por otros autores, Deng et al. (2010) informaron que la supervivencia de tilapias expuestas a concentraciones de AFB₁ que variaron de 19 a $1641 \mu\text{g kg}^{-1}$ durante 20 semanas no presentó diferencias significativas respecto al control. De un modo similar, Anh Tuan et al. (2002), tampoco observaron diferencias significativas en la supervivencia de la tilapia del Nilo cuando los peces fueron expuestos con niveles de AFB₁ de $10000 \mu\text{g kg}^{-1}$ durante 8 semanas.

Estas discrepancias en la toxicidad dependerían no sólo de la especie, sino también de las condiciones del ensayo y la edad del pez, la presencia de otras micotoxinas y la sinergia de las mismas entre otros factores (Wang 2016, Marijani et al. 2019, Oliveira and Vasconcelos 2020). De lo expuesto, se desprende como resultado relevante del presente capítulo que el pacú poseería una sensibilidad semejante a la de aquellos peces tolerantes a los efectos letales de la AFB₁ en el alimento.

Indicadores de hepatotoxicidad

Del análisis de los datos obtenidos para los indicadores de hepatotoxicidad, se observó que los efectos detectados no dependen sólo de la concentración de AFB₁ en el alimento, sino que existe una relación entre el consumo prolongado (tiempo de exposición) del alimento contaminado con AFB₁ y la concentración de la toxina en el alimento.

De los datos obtenidos en el análisis de residuos, se tiene la certeza de que la AFB₁ fue metabolizada por los peces. Las concentraciones detectadas en el musculo, demuestran esta afirmación, por su parte las diferencias en las concentraciones detectadas en los ensayos 2 (24 h de ayuno previo a la toma de muestra) versus concentraciones y tiempos similares del Ensayo 1 en el Capítulo 2, confirman lo ya indicado sobre la gran capacidad de la especie de metabolizar la AFB₁ y excretar rápidamente los metabolitos.

En general los efectos relevantes detectados por el consumo de AFB₁ se observaron con claridad a largo plazo, 70 días de exposición, reflejado por el daño hepático. Esta afirmación se corresponde tanto a nivel histológico como bioquímico. A 30 y 50 días de exposición se observan alteraciones en los cortes histológicos de hígado característicos de las primeras etapas de enfermedades hepáticas para otras especies, como hígado graso no alcohólico (HGNA/NAFLD), que se manifiesta a nivel histológico por la deposición lipídica hepatocelular, un signo comúnmente reportado para aflatoxicosis en peces (Zychowski et al. 2013). Por otro lado, las altas concentraciones de AFB₁ y tiempos prolongados de exposición (>100 µg kg⁻¹ y 70 días) indujeron signos de necrosis hepatocelular. En particular el puntaje de daño histopatológico, obtenido mediante recuento acumulado, indicó que la concentración es un factor clave en el daño hepático, y que el hígado tiene la capacidad de reparar los daños ocurridos a bajas concentraciones de AFB₁. Esta afirmación se sostiene por la presencia de tejido cicatricial (fibrosis) y ausencia de esteatosis en los cortes histológicos de los hígados expuestos por 70 días a 1 µg kg⁻¹. En la evaluación de cada parámetro, los resultados indicaron que la esteatosis prevalece en periodos cortos de exposición y decrece con el tiempo de exposición. Probablemente, debido a que con el incremento del tiempo de exposición se esté desarrollando una esteatosis del tipo microvesicular donde el núcleo no está desplazado y las gotas individuales son difíciles de visualizar con técnica histológica convencional como explica (Arab et al. 2014). La bibliografía indica que en general la presencia de esteatosis microvesicular se asocia a signos de daño hepatocelular que incluyen

balonización y fibrosis. En general este tipo de esteatosis se asocia daño hepático por drogas o trastornos del metabolismo de ácidos grasos de cadena larga (Xu et al. 2021).

Por su parte los resultados indicaron que la infiltración se incrementa con la concentración de la toxina pudiendo verse, en ocasiones, la presencia de cuerpos hialinos de Mallory, mientras que la severidad de la balonización se incrementa según la interacción del tiempo de exposición y la concentración de exposición.

Los resultados obtenidos para la acumulación excesiva de grasa en el hígado (esteatosis) se corresponden a lo reportado por Michelin et al. (2021b) para la misma especie en los primeros 30 días de exposición. Donde los autores indican que la exposición a las aflatoxinas en la dieta provoca cambios en el hígado, como la muerte celular y la degeneración grasa e hidrópica.

La aplicación del modelo desarrollado para la evaluación de daño histopatológico, indicó que el parámetro clave es la concentración de AFB₁ en la dieta, superando el valor propuesto por Arab et al. (2014) para el diagnóstico de hígado graso sólo en la concentración de 10000 µg kg⁻¹ (valor de referencia >5).

A nivel bioquímico, el comportamiento de aquellas enzimas, en las cuales se observó que la actividad fue alterada por el consumo de AFB₁, en general presentaron un incremento de su actividad a concentraciones bajas y tiempos cortos de exposición, pero luego una disminución de su actividad a mayor tiempo de exposición y concentración de AFB₁ en el alimento. De acuerdo al paradigma que explica la evolución de la condición fisiológica de un organismo en respuesta a la exposición a un tóxico (Depledge and Fossi 1994), el incremento de la actividad de las enzimas a bajas concentraciones de AFB₁ y tiempos cortos de exposición puede interpretarse como una respuesta del sistema tendiente a compensar el efecto de la toxina. Por otra parte, la disminución observada en la actividad hepática para las enzimas a mayores tiempos de exposición y concentraciones más elevadas se explicaría por el agotamiento de la capacidad compensatoria y la aparición de daño hepático asociado, por

ejemplo, al aumento de la permeabilidad de la membrana del hepatocito alterada y la necrosis hepática. Se han descritos tales efectos inducidos por la oxidación de AFB₁ en AF-8-9-epóxido (Niki et al. 2005, El-Mekkawy et al. 2020).

Los efectos observados en la actividad de las enzimas de los animales expuestos a AFB₁, respecto al grupo control, se ajustan al modelo de Síndrome General de Adaptación (GAS)(Newman 2019), donde se puede observar a tiempos cortos de exposición (30 días) una reacción inicial de “alarma” expresada como incremento en la actividad enzimática, luego a tiempos de exposición intermedios se observa un estado de “resistencia”, donde la actividad enzimática del grupo expuesto a AFB₁, no se diferencia del control y finalmente a tiempos de exposición prolongados a AFB₁, se observa una fase de agotamiento donde la actividad enzimática se ve suprimida en los grupos expuestos respecto al control.

A su vez, la disminución de las enzimas de Fase I y II, podría afectar la capacidad de detoxificación y la acumulación de la toxina. Los valores encontrados para estas enzimas estarían en concordancia con los valores encontrados para otras especies como tilapia (Deng et al. 2010) o para los valores hallados en plasma para la especie de estudio por Michelin et al. (2021b).

Un hallazgo interesante de este estudio fue que a bajas dosis de AFB₁ y tiempos de exposición relativamente cortos (30 días), las enzimas de Fase 1 y Fase 2, presentan un incremento en su actividad respecto al control. Aunque no en todos los casos fue estadísticamente significativo, se observó la tendencia en casi todas ellas y sería interesante para futuros trabajos evaluar lo que ocurre entre el día 1 de exposición y el día 30 a estas concentraciones, no sólo como sistema de compensación sino también considerando la posible bioacumulación de los metabolitos generados por estas enzimas.

Un análisis particular, debe hacerse sobre la actividad de la enzima ALP, la cual presento un incremento en la actividad a partir del día 50 de exposición respecto al control. Llama la atención que mantiene e incrementa su actividad, aunque el hígado este dañado. Es

poca la información sobre la actividad de la enzima en hígado, ya que generalmente se mide sobre plasma, medición que no se pudo realizar en este trabajo ante la falta de volumen suficiente de plasma para todos los ensayos programados. En los trabajos que miden el efecto sobre ALP en hígado, detectan que tiene un comportamiento similar a las transaminasas, contrastando con los resultados obtenidos en este ensayo (Yamada et al. 1985, Lateef 2021).

Parámetros de desempeño biológico, índices de desempeño productivo, condición y composición centesimal de carnes

Los trabajos publicados sobre acuicultura indican que para la mayoría de las especies de peces la exposición a AFB₁ causa un efecto adverso en la tasa de crecimiento (SGR), siendo este uno de los principales efectos negativos en especies como la tilapia (*Oreochromis niloticus*), la Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), el esturión estrellado (*Acipenser stellatus*) y el pez gato iridiscente (*Pangasianodon hypophthalmus*). Los signos clínicos más comunes asociados a la aflatoxicosis en los peces incluyen la palidez de las branquias, la alteración de la coagulación de la sangre, bajas tasas de crecimiento y la falta de aumento de peso (Deng et al. 2010, Santos et al. 2010, Ayyat et al. 2018, Gonçalves et al. 2018a, Jalilpour et al. 2018, Deng et al. 2020, Xu et al. 2021).

Sin embargo, especies de peces de aguas cálidas, como el bagre de canal (*Ictalurus punctatu*), el Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y el pez cebra (*Danio rerio*) son menos sensibles a la aflatoxina. Por ejemplo, estudios realizados sobre bagre de canal expuestos a concentraciones de AFB₁ en las dietas (100 a 2154 µg kg⁻¹ AFB₁) revelaron que la toxina en el alimento no causó una reducción significativa en el aumento de peso o hallazgos histopatológicos (Jantrarotai et al. 1990).

En el presente estudio, se observaron incrementos significativos en la tasa de crecimiento (SGR) de los grupos expuestos a AFB₁ durante 30 y 50 días. Resultados similares

se han reportado estudios donde el consumo de AFB₁ tienen propiedades estimulantes en el crecimiento. Por ejemplo, en la carpa prusiana (*Carassius gibelio*), concentraciones de 50 a 1000 µg kg⁻¹ de AFB₁ en el alimento por 4 y 12 semanas indujeron tasas de crecimiento de hasta el 11 % superiores al grupo control (Huang et al. 2011). Otros estudios han reportado efectos similares para el camarón de la India (*Fenneropenaeus indicus*) con concentraciones de AFB₁ de 20 a 50 µg kg⁻¹ durante 4 semanas (Ghaednia et al. 2013). A diferencia del SRG, el índice de condición K no mostró diferencias significativas que permitan atribuir cambios en las condiciones fisiológicas relacionadas a la concentración de AFB₁.

Las variaciones de HSI corresponde a lo informado para otras especies como la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*), donde se puede observar que concentraciones bajas e intermedias de AFB₁ y tiempos de exposición cortos, los valores de HSI se ven incrementados y estos valores disminuyen al aumentar la concentración de toxina o prolongar el tiempo de exposición (Zychowski et al. 2013). Este comportamiento se corresponde con el observado para la mayoría de las enzimas hepáticas y con la evolución del daño hepático en el cual primero predominó la acumulación de lípidos (esteatosis) y luego el daño indicado por las células cirróticas y acumulación de colágeno.

En consecuencia, las variaciones observadas en el HSI y SGR indicarían la posible presencia de un efecto estimulante a dosis bajas y un efecto tóxico o inhibitorio de dosis altas en forma de “U invertida” (hormesis) como lo reportaron para otras especies (Calabrese 2008, 2010, Zahran et al. 2020). Los casos de hormesis asociada a AFB₁ también se han documentado en otras especies como se mencionó. Por lo que los resultados evidenciarían efectos horméticos asociadas al consumo el consumo de alimento con bajas dosis AFB₁ durante periodos cortos de tiempo.

En cuanto a los parámetros de calidad de carne evaluados, los mismos se vieron afectados a todas las concentraciones de AFB₁ que se evaluaron. Principalmente el contenido de materia grasa, el cual se vio incrementado por la relación entre tiempo de exposición y

concentración de la toxina. Los valores de humedad y cenizas difirieron respecto a los hallados para la misma especie (Lima et al. 2012). Sin embargo, tales valores se encontraron dentro de los esperados, ya que los mismo pueden variar por la época del año, calidad y cantidad de alimento suministrado y edad del animal, entre otros factores (Hoof et al. 2011, Zychowski et al. 2013, Wang 2016).

Interrelación de los parámetros evaluados

Los parámetros toxicodinámicos a nivel bioquímicos e histológico, mostraron una clara respuesta a nivel del hígado del pacú frente a la exposición a concentraciones subletales de AFB₁. Como se mencionó previamente, a bajas concentraciones y tiempos de exposición cortos, hubo una respuesta “estimulante” y luego una respuesta inhibitoria y de daño señalando un efecto negativo. Esto se vio reflejado sobre de los parámetros de calidad de carne, como un el aumento del porcentaje de materia grasa en el músculo. La variación de la composición centesimal del musculo ya ha sido señalada como un buen indicador del daño hepático por otros autores (De Bandt et al. 2018). Sin embargo, los daños a nivel hepático no se alcanzaron a manifestar sobre los parámetros de desempeño biológico. Por un lado, no se evidencias cambios en los parámetros de condición “K” y la relación “longitud/peso” a ninguna concentración ni tiempo de exposición. Por otro, los parámetros que sí respondieron a la exposición, HSI y SGR, lo hicieron mostrando un efecto estimulante de la AFB₁ sólo a bajas dosis y cortos periodos de tiempos de exposición, indicando la posible presencia de un efecto hormético que podría llevar a falsas conclusiones si las evaluaciones se realizan sólo a periodos cortos de tiempo.

Conclusiones parciales

En el presente capítulo se evaluó la toxicodinámica de AFB₁ en pacú expuestos a concentraciones agudas y crónicas de esta toxina en el alimento. Se estimaron efectos sobre parámetros bioquímicos e histológicos, como así también sobre índices de desempeño biológico con interés productivo y de calidad de carnes. Las principales conclusiones alcanzadas son:

- Se puede ubicar al pacú entre las especies tolerantes a la AFB₁ ya que pese a las elevadas concentraciones ensayadas (hasta 100000 µg Kg⁻¹) no se evidenció mortalidad en ninguno de los tratamientos y en condiciones normales de cría no serían esperables efectos letales agudos producto del consumo de alimento contaminado con la toxina debido a que las dosis ensayadas fueron muy superior a las que se pueden encontrar en los alimentos balanceados según lo evaluado en el Capítulo 1.
- Las exposiciones crónicas a alimento contaminado con concentraciones subletales de AFB₁ (70 días), producen alteraciones a nivel histológico y bioquímico, que se corresponden con daño hepático por aflatoxicosis y enfermedades hepáticas como hígado graso no alcohólico (HGNA/NAFLD). Aunque estos efectos no llegaron a afectar los índices de desempeño biológico en el tiempo evaluado, alteraron parámetros comerciales como ser composición centesimal de carne. Probablemente, prolongando los tiempos de exposición se observarían cambios en el desempeño biológico.

- Dosis bajas y exposiciones cortas a la toxina inducen efectos estimulantes a nivel de las respuestas enzimáticas y los parámetros de desempeño biológico, pero un efecto inhibitorio y tóxico a dosis altas y tiempos prolongados, mostrando una respuesta de tipo hormética en forma de “U” invertida en algunos parámetros de desempeño biológico y actividades enzimáticas que se corresponderían con el marco teórico del síndrome general de adaptación.
- La calidad de carne medida en el filete, se vio afectada principalmente por un aumento del porcentaje de materia grasa y una disminución en el porcentaje de humedad a cualquier dosis de exposición AFB₁.

CAPÍTULO 4:

Metabólica: Identificación de biomarcadores plasmáticos específicos y no destructivos, de exposición y/o efecto, disparados por la contaminación del alimento por AFB₁

Introducción

Metabolómica

La metabolómica es el estudio global de las pequeñas moléculas (normalmente de menos de 1,5 kDa) presentes en una muestra biológica. (Gilbert et al. 1999). El conjunto de todos los metabolitos se denomina metaboloma, siendo los metabolitos, los productos finales de los procesos de regulación en el organismo, por lo que son de gran interés para caracterizar el fenotipo.

La composición de los metabolitos en un biofluido como ser: orina, sangre, el fluido cerebroespinal, la saliva o incluso en tejidos o cultivos celulares refleja el estado fisiológico de los organismos y puede ser interpretada como una medida cuantitativa y multiparamétrica de la respuesta de un ser vivo a un estímulo fisiopatológico o a una modificación genética (Nicholson et al. 2006, Zamboni et al. 2015). Siendo el plasma y el suero, dos fluidos sanguíneos, que probablemente son más estudiados en vertebrados, incluidos los humanos, por sus características, ambos difieren en perfil metabólico obtenido, mientras que el plasma se obtiene utilizando aditivos para evitar la coagulación (anticoagulantes), el suero se obtiene después del proceso de coagulación, por lo que la elección de uno u otro fluido variara en función del estudio a realizar (Carriquiriborde 2020). Debido a su facilidad de obtención son en general los fluidos de preferencia para los estudios de metabolómica.

En el estudio de la metabolómica, una de las herramientas más útiles para analizar metabolitos de moléculas pequeñas, es la cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS). Por lo general, dependiendo de las muestras disponible y la naturaleza de la misma, esta técnica permite detectar entre miles o decenas de miles de iones, que permiten identificar los metabolitos de acuerdo a su patrón de fragmentación siendo actualmente el medio más utilizado para determinar los fenotipos metabólicos a través de análisis dirigidos y no dirigidos (Gika et al. 2019).

La metabolómica se ha aplicado a muchos campos, como la salud, la nutrición, la agro-ciencia, ecotoxicología y la microbiología (Panpatte and Jhala 2021). Entre los ejemplos podemos nombrar: un estudio sobre perfil metabólico del líquido cefalorraquídeo en humanos para detectar efectos contraproducentes y comprender la farmacología de los sedantes en pacientes con patologías previas (Li et al. 2022) y el análisis del perfil metabolómico de sangre seca, de niños para la evaluación de los beneficios de los efectos de la suplementación con salvado de arroz, sobre múltiples vías metabólicas durante el crecimiento infantil (Pfluger et al. 2022). También se ha utilizado para la identificación de potenciales compuestos biológicamente activos en plantas (Grauso et al. 2019). En toxicología, el perfil metabolómico del suero en humanos se ha utilizado para evaluar las alteraciones metabólicas asociadas al consumo de frutas y verduras contaminadas con fitosanitarios (Hood et al. 2022) o la identificación de biomarcadores específicos en orina humana en el biomonitoreo de micotoxinas y sus respectivos metabolitos (Narváez et al. 2021). También, se ha utilizado el perfil de metabolitos del suero de ratones para evaluar compuestos específicos como clorpirifós o cadmio (Xu et al. 2020)

Fenotipado metabólico no dirigido

En el caso de fenotipado metabólico no dirigido, un problema persistente y actualmente intratable, es que ninguna de las metodologías actuales, es capaz de proporcionar el análisis completo requerido de todas las clases de metabolitos mediante una sola metodología analítica. Además, como se mencionó previamente, en el caso particular de la espectrometría de masas, la gran cantidad de iones obtenidos genera que no sea factible técnica y económicamente el agregado de estándares internos para cada compuesto. Por lo tanto, la identificación inequívoca de todos los iones detectados y la identificación perfiles

metabólicos completos, probablemente sea inalcanzable, utilizando cualquiera de las tecnologías disponibles en la actualidad.(Gika et al. 2019)

En la mayoría de los casos, sólo pueden identificarse algunos cientos de metabolitos. Como paso importante del estudio metabolómico, la comparación de picos suele realizarse entre decenas y cientos o de datos metabólicos de muestras biológicas para generar una tabla de picos. La información de la tabla de picos se utilizará para estudios metabolómicos posteriores, como el descubrimiento de biomarcadores, la explicación del mecanismo de las enfermedades, etc. Se han desarrollado muchos programas informáticos para realizar la detección de picos y la correspondencia entre las muestras analizadas. (Gika et al. 2019)

XCMS

El XCMS es una de las plataformas de acceso abierto más populares para el reconocimiento y la alineación de los espectros de iones obtenidos (la versión basada en la web se puede encontrar disponible gratuitamente en <https://xcmsonline.scripps.edu>) (Tautenhahn et al. 2012).

Para el preprocesamiento de los datos obtenidos, se pueden tomar dos estrategias generales (es posibles encontrar variaciones y combinaciones de esas estrategias):

- Dividir la señal en contenedores, incorporando todos los datos en un perfil de reconocimiento para cada muestra.
- Identificar y cuantificar individualmente los picos importantes, descartando los datos que no se consideren parte de un pico.

Dependiendo de la variación esperada en los datos y de la pregunta experimental que se haga, una técnica puede ser más útil que la otra. Si discriminar picos no es trivial o si los picos son difíciles de resolver entre sí, entonces el agrupamiento puede ser la estrategia más efectiva. Si se esperan cambios correlacionados en la distribución de la señal, cualquiera de

los métodos de preprocesamiento puede ser igualmente útil. Estas variaciones a menudo se analizan con técnicas multivariadas como el análisis de componentes principales (PCA) o análisis discriminante mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).

El XCMS identifica los picos cuya intensidad relativa varía entre los grupos de muestras y calcula los valores p , así como las veces que difieren sus áreas. El software se ha utilizado para una amplia gama de aplicaciones, incluido el grado de maduración de frutos en plantas (Patil et al. 2020), Investigación sobre el cáncer (Forsberg et al. 2018) o patogenicidad de la hepatitis B (Zhao et al. 2018)

El flujo de trabajo del podría reducirse a:

- Detección de picos: Identificación de todas las señales presentes en los perfiles metabolómicos causadas por metabolitos reales, eliminando otras señales espurias. Para ello, los datos son filtrados para reducir el ruido instrumental, y son seleccionados los picos por encima de una relación señal-ruido de corte.
- Integridad/calidad de los datos: Se eliminan falsos positivos mediante réplicas y calculadoras de aductos, la espectrometría de masas suele tener problemas de aductos, isótopos y fragmentos productos por la ionización, que generan falsos positivos.
- Alineamiento: corrección de la variabilidad inter-muestral en los tiempos de retención.
- Normalización: eliminación de fuentes de variación sistémica entre muestras (ej. cambios en la sensibilidad instrumental, diferencias en el factor de dilución de las muestras) a fin de garantizar que los distintos cromatogramas sean comparables.
- Análisis univariado de correlaciones, tasa de cambios, análisis de varianza.
- Análisis de vías metabólicas, evaluación de iones contra tabla de aductos en base de datos METLIN, de acuerdo con el modelo biológico elegido.

- Obtención de Tabla de datos: generación de tabla de intensidades muestra por muestra de los iones obtenidos.

Uso de animales en metabolómica

Los modelos animales ofrecen la capacidad de manipular genes de interés o inducir enfermedades de manera controlada e investigar las respuestas metabólicas a nivel de todo el organismo. Entre los animales utilizados comúnmente encontramos ratones, ratas, cobayos, vacas, cerdos, conejos, peces. Los peces han sido utilizados históricamente, como organismos de prueba y centinela para evaluar la contaminación acuática. Además, como vertebrados, se han utilizado con frecuencia como especies sustitutas para estimar el efecto de los contaminantes en la salud humana (Carriquiriborde 2020).

Los estudios que evalúan las respuestas metabólicas de micotoxinas sobre animales datan de 1970 y desde ese momento se han encontrado 474 artículos revisados por pares en la base de datos Scopus, realizando la siguiente búsqueda: TITLE-ABS-KEY (animal AND mycotoxin AND metabolic). Los estudios basados en ensayos de metabolómica (dirigidos y no dirigidos) sobre efectos de las micotoxinas en peces se remontan a los últimos 15 años, de la búsqueda específica en la base de datos Scopus, se han encontrado hasta el momento 13 artículos revisados por pares de micotoxinas en general, de los cuales uno solo de estos es específico de metabolómica en peces para determinar efectos inducidos por aflatoxinas (Zuberi et al. 2019). En ese estudio, Zuberi et al., (2019) utilizaron un modelo toxicológico embrionario de pez cebra (*Danio rerio*), para caracterizar los perfiles metabólicos asociados con la exposición a AFB₁ y les permitió proponer un modelo integrado de la hepatotoxicidad de AFB₁. Como resultados relevantes detectaron pérdida de la integridad de la membrana celular y alteraciones en la desintoxicación de moléculas asociadas principalmente a la disminución de la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST), enzima esencial en la

desintoxicación hepática de fase II. Por otro parte, las vías metabólicas asociadas con el hígado, como ser el metabolismo de aminoácidos, lípidos y carbohidrato, se vieron alteradas. Tales efectos son coincidentes con los resultados de hepatotoxicidad informada previamente en sistemas de mamíferos (Zhang et al. 2011).

En otras especies, Ogunade et al.(2019), detectaron que el consumo de AFB₁ en vacas lecheras, podía ser determinado en plasma mediante el análisis de las concentraciones de aquellos metabolitos que se vieron afectados por el consumo de dietas contaminadas con la toxina. En ese estudio, las concentraciones de aminoácidos como, alanina, leucina, arginina, fenilalanina, metilhistidina y citrulina presentaron valores disminuidos, mientras los valores de etanol y el ácido acético en plasma resultaron alterados por la AFB₁, siendo estos dos últimos indicadores de alteración de las bacterias del rumen.

Por su parte Cheng et al. (2017) informaron que el consumo de dietas contaminadas con AFB₁ por cabras induce alteraciones en el metabolismo de Cori y del ciclo de Krebs, observándose variaciones en los niveles de glucosa y el lactato en el plasma y una disminución de las reservas de ATP por las alteraciones del ciclo de Krebs. En las vías metabólicas alteradas, se informaron efectos sobre metabolitos relacionados con los lípidos (variaciones en niveles de acetona, acetoacetato, β -hidroxibutirato, colina, glicerofosforilcolina, lipoproteínas y N-acetilglicoproteínas); carbohidratos (variaciones en niveles de lactato, la glucosa, el citrato y el acetato) y aminoácidos (variaciones en niveles de citrulina, la leucina/isoleucina, valina, glicina, creatina y betaína).

Dado los efectos de la AFB₁ sobre el metabolismo y la capacidad de la metabolómica para evaluar respuestas a dicho nivel, esta herramienta puede ser utilizada para identificar biomarcadores y desarrollar una herramienta novedosa para detectar la exposición a AFB₁ en peces.

De acuerdo con lo expuesto en los capítulos anteriores, y a lo argumentado en los párrafos precedentes, se plantean las siguientes hipótesis.

Hipótesis específicas

- *El perfil normal de metabolitos de bajo peso molecular (>1500 dalton) en el plasma de los peces los peces alimentados con AFB₁ sufren variaciones que pueden ser identificadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.*
- *Las variaciones producidas en el perfil metabolómico del plasma, debido al consumo crónico de AFB₁, presentan una dependencia con la concentración a la toxina en el alimento.*
- *Tales alteraciones permiten identificar metabolitos que actúan como biomarcadores de exposición/efecto.*

Objetivos particulares

- *Estudiar las variaciones producidas en el perfil de metabolitos de bajo peso molecular en plasma de Pacú expuesto crónicamente por vía de la alimentación a concentraciones subletales de AFB₁.*
- *Identificar metabolitos/iones característicos, que presenten una respuesta a la concentración de AFB₁, como posibles candidatos a ser utilizados como biomarcadores de exposición y o efecto.*
- *Modelizar un método de identificación de exposición a concentraciones subletales de AFB₁, basado en los biomarcadores identificados.*

Materiales y métodos

Estrategia experimental

Las hipótesis aquí planteadas se pusieron a prueba sobre la base del diseño experimental explicado en el Ensayo 3 del Capítulo 2. En el mismo, juveniles de Pacúes se expusieron crónicamente durante 70 días por vía de la alimentación a 3 concentraciones subletales de AFB₁ y los plasmas obtenidos de cada ejemplar se evaluaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para analizar las respuestas en los perfiles metabólicos de la muestra.

Preparación de la muestra

Se extrajeron, con jeringa heparinizada muestras, de sangre de todos los animales previo al sacrificio de para cada tiempo y concentración de exposición. Las muestras se transfirieron inmediatamente a microtubos tubos de 2 ml que se centrifugaron a 4 °C a 6000 rpm durante 10 min. El plasma sanguíneo obtenido se trasvasó a microtubos de 500 µl y se conservaron a -80 °C.

Luego, el plasma fue procesado según el procedimiento descrito por Gowda et al. (2014), con modificaciones. A 100 µl de plasmas se añadieron 400 µL de MeOH/ACN (50:50 %V/V) a 4 °C y se agito durante 1 minutos en Vortex. Seguido, las muestras fueron llevadas a -20 °C durante 1 h y posteriormente se sonicaron en un baño de agua durante 5 min. Este ciclo de enfriado combinado con sonicación se repitió dos veces. Finalmente, para favorecer la precipitación de las proteínas, las muestras se incubaron durante 1 h a -20 °C y se centrifugaron a 15000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 400 µl de sobrenadante y se le agregaron 400 µl de H₂O ultrapura (tipo I). Las muestras se centrifugaron a 15000 rpm durante 10 minutos y se trasvasaron los sobrenadantes a viales de HPLC, almacenándose a -20 °C hasta el análisis cromatográfico.

Análisis cromatográfico

Los extractos obtenidos se analizaron en un sistema de cromatografía líquida de ultra eficiencia (UHPLC) acoplado a un detector de espectrometría de masas cuadrupolar, ACQUITY UPLC-SQD (Waters, Milford, MA, EE. UU). La separación cromatográfica fue realizada utilizando C₁₈ como fase estacionaria, utilizando una columna HSS T₃ C₁₈ (1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm). Las condiciones cromatográficas y la fase móvil utilizadas se presentan en la Tabla 4. 1.

TABLA 4.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS UPLC ESTUDIO METABOLÓMICA.

Fase estacionaria	C ₁₈	
Columna	HSS T ₃ C ₁₈ (1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm)	
Temperatura del Horno	40° C	
Volumen de inyección	20 µl	
Fase móvil A	Ácido fórmico al 0,1% en H ₂ O	
Fase móvil B	Ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo	
Flujo	0,2 ml/minuto	
Gradiente	Tiempo	% B
	0	5
	2	5
	6	60
	11	100
	18	100
	20	5
	22	5

La ionización de los metabolitos eluidos de la columna cromatográfica se realizó mediante el uso de una fuente de ionización por electro spray (ESI) en el modo de ionización positiva (ESI+) y negativa (ESI-). El espectro de masa de los metabolitos fue luego analizado en modo barrido (Full-Scan), en un rango de masas (m/z) fue de 60 a 2000. El voltaje de electro-pulverización fue de 3,50 kV, la temperatura de desolvatación fue de 350 °C, la

temperatura del cono fue de 150 °C, el caudal de nitrógeno fue de 750 l/h para el gas de desolvatación y de 50 l/h para el gas de cono, el voltaje de cono fue de 30 V. El análisis de datos de las corridas se realizó con el programa MassLynx™.

Reprocesado de los cromatogramas

Para el reprocesado de los cromatogramas se desarrolló un protocolo de acuerdo con aquellos disponibles para metabolómica no dirigida, mediante el software de código abierto XCMS (Smith et al. 2006). Los archivos de cada corrida (cromatogramas tridimensionales tiempo x m/z x intensidad) fueron exportados mediante el programa MassLynx™ al formato “CDF” y agrupados en carpetas de archivos según el tratamiento correspondiente (tiempo de exposición y concentración de AFB₁). Luego estos archivos fueron reprocesados mediante la plataforma online de XCMS y verificado por la versión del programa XCMS que corre sobre la plataforma R. (Gowda et al. 2014, Costa et al. 2016, Prasain 2016, Domingo-Almenara and Siuzdak 2020, Pang et al. 2020).

El procesamiento de cada conjunto de datos fue realizado utilizando parámetros establecidos de acuerdo con lo indicado en la bibliografía para el equipo utilizado (Smith 2017) y verificado en muestras a las cuales se le sobreagregaron patrones externos de AFB₁. El código de R y los parámetros del XCMS online, pueden observarse en Anexos Protocolos XCMS.

Curado de tabla de datos

La tabla obtenida de iones fue curada con el fin de obtener aquellos iones estadísticamente significativos procesados a partir del XCMS, que permitan realizar un análisis multivariado y la identificación de metabolitos y biomarcadores putativos.

Para el curado de la tabla de datos se:

- eliminaron los iones con una intensidad $< 10^3$ (ruido instrumental), cuyo tiempo de elusión cromatográfico fuera inferior al del volumen muerto de la columna (= 1,2 minutos) y cuyo tiempo de elusión fuera superior al tiempo de reacondicionamiento de la columna, 13 minutos.
- descartaron aquellos iones, que mediante un análisis estadístico no paramétrico (Kruskal-Wallis) presentaron un $p > 0,05$.
- estimó la razón de cambio (Fold Change) de acuerdo con la Ecuación 4.1 usada por XCMS.

$$\text{Fold Change}_{ion\ x} = \frac{\text{Promedio Señal (ion x) en Tratamiento}}{\text{Promedio Señal (ion x) en Control}} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Para una mejor interpretación de los resultados, aquellas razones de cambio menores a “1”, iones que suprimen su señal respecto al control, fueron transformados mediante una potencia de exponente -1, según la Ecuación 4.2.

$$\text{Fold Change}_{ion\ x\ Suprimido} = \text{Fold Change}_{ion\ x}^{-1} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

- tomaron en cuenta para los futuros análisis, aquellos iones que presentaban valores de Fold Change > 3 y Fold Change $_{Suprimido} < -3$, en alguno de los tres tratamientos de exposición.
- Sobre los iones seleccionados, se descartaron aquellos que no cumplieran con un criterio monotónico, entre los tratamientos. Y aquellos iones cuyo tiempo de elusión cromatográfico fuera inferior al tiempo de elusión del frente de solvente (volumen muerto de la columna= 1,2 minutos), y aquellos iones cuyo tiempo de elusión fuera superior al tiempo de reacondicionamiento de la columna, 13 minutos.

Análisis multivariado de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS, partial least square)

Para los iones que cumplieron los criterios previos, se analizaron mediante técnicas de PLS las intensidades en relación a las concentraciones de exposición a AFB₁, procurando desarrollar un modelo que permita predecir las relaciones de las caracterizaciones. Para ello se usaron paquetes estadísticos en R.

Para el armado del modelo se utilizaron el 80 % de las muestras y el 20 % restante se reservaron para su posterior validación, utilizando el Package PLS en R. (Mevik et al. 2019) el modelo fue armado para 10 componentes, mediante la validación cruzada de LOO (dejando uno fuera), por sus siglas en inglés leave-one-out.

La evaluación de los componentes del modelo se estimó a partir del valor del error cuadrático medio de predicción (RMSEP), por sus siglas en inglés (Root Mean Square Error of Prediction), eligiendo aquel valor que indicara el mínimo error del modelo. A partir de los coeficientes de regresión, se evaluaron cuáles eran las variables más significativas, para estimar las concentraciones en los componentes extraídos. La detección de variables significativas se basó en descartar todas las variables en las cuales los cuadrados de los pesos (w_i^2), ponderados por la varianza explicada por el componente respectivo, fueran inferiores al 5% del acumulado en los componentes del modelo seleccionado, de acuerdo con la Ecuación 4.3.

$$\sum w_i^2 \frac{Var.Comp}{Var.Total} * 100 > 5\% \quad (Ecuación 4.3)$$

w_i^2 Peso de la variable al cuadrado en el modelo PLS-r

Las variables detectadas como significativas fueron seleccionadas como biomarcadores putativos.

Mapeo de rutas predictivas

Para para la identificación de posibles metabolitos y rutas metabólicas afectadas por la exposición a AFB₁, a partir de la tabla de picos estadísticamente significativos procesados a partir del XCMS, se generó un gráfico de nube de las rutas desreguladas, ordenando los valores obtenidos de acuerdo con:

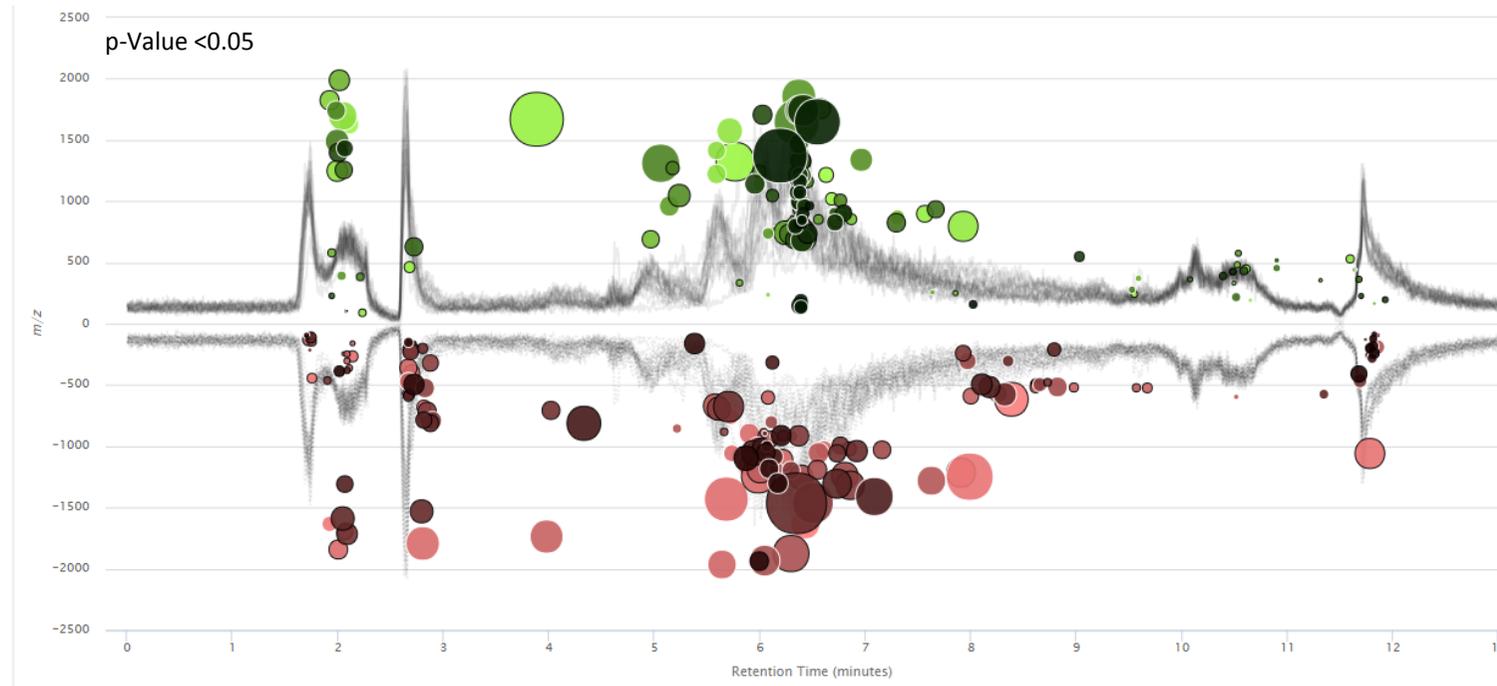
- Importancia estadística creciente en el eje y
- Superposición de metabolitos en el eje x
- Número total de metabolitos en la ruta representada por el radio de los círculos

Como modelo biológico de comparación, se utilizó el pez cebra (*Danio rerio*). A partir de este mapeo se pudo predecir, cuáles serían las posibles rutas metabólicas afectadas por el consumo de AFB₁ y se buscaron coincidencias con los biomarcadores putativos seleccionados.

Resultados

Variaciones producidas en el perfil de metabolitos de bajo peso molecular en plasma de Pacú expuesto crónicamente por vía de la alimentación a concentraciones subletales de AFB₁

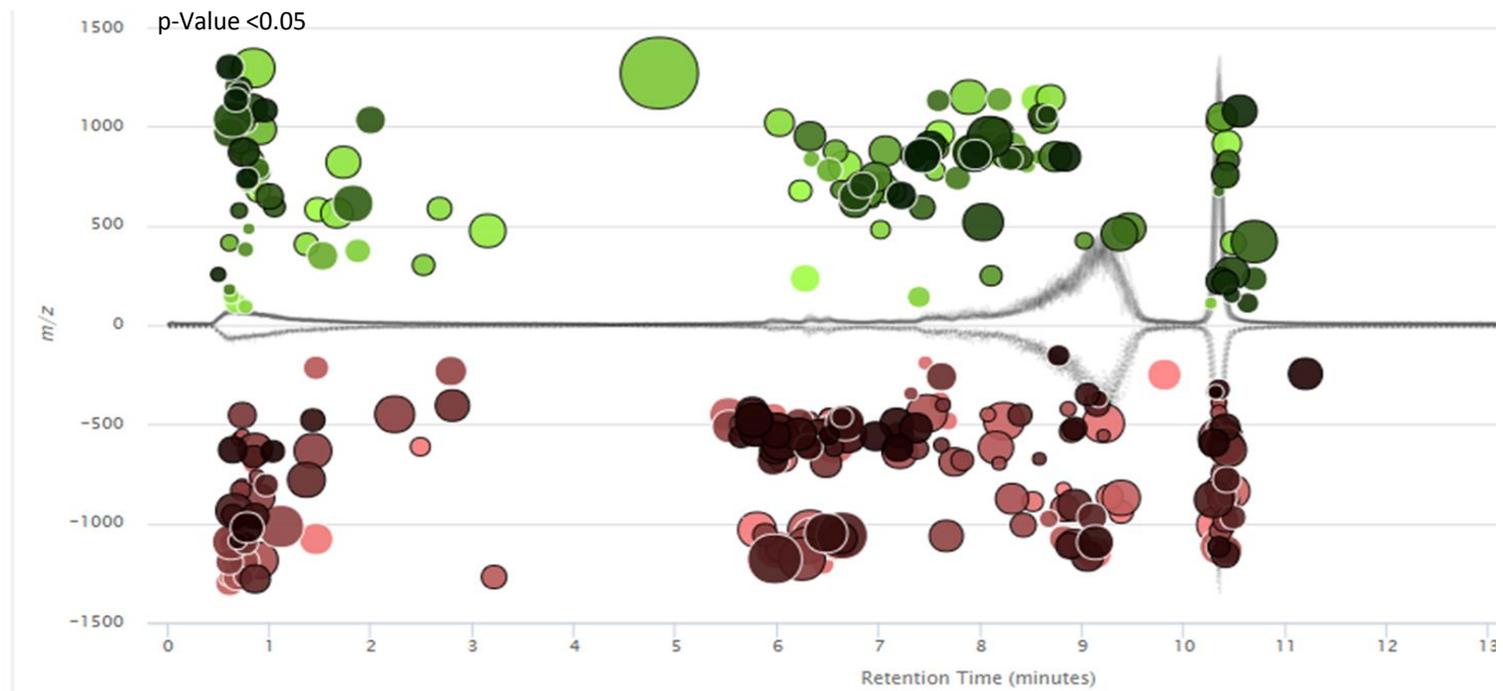
Se evaluaron las variaciones producidas en los perfiles de metabolitos plasmáticos de los peces expuestos a AFB₁ en el Ensayo 3 y se observaron diferencias tanto en aquellos iones con capacidad de estabilizar cargas positivas, formando aductos como ser $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-2H_2O]^+$, $[M+K]^+$, $[M+CH_3OH]^+$, $[M+ACN]^+$, como aquellos con capacidad de estabilizar cargas negativas formando aductos $[M-H]^-$, $[M-H_2O-H]^-$, $[M-2H_2O-H]^-$, $[M-Na-2H]^-$, $[M-Cl]^-$, entre otros. El mayor número de iones con intensidades mayores o menores a la de aquellos en los peces control se evidenciaron en tiempos de retención comprendidos principalmente entre 1,5 y 3 minutos entre los 5 a 10 minutos, como se puede observar en las Figuras 4.1. y 4.2.



■ En verde Iones que presentan exaltación de la señal respecto al control ■ En Rojo Iones que presentan supresión de la señal respecto al control

El valor p está representado por la intensidad del color de las esferas, La tasa de cambio (fold change) está representado por el radio de las esferas. El tiempo de retención cromatográfico está representado por la posición en el eje x , La relación masa-carga se representa por la posición en el eje Y .

FIGURA 4.1. VARIACIONES PRODUCIDAS EN EL PERFIL DE PICOS, DETECTADOS MEDIANTE IONIZACIÓN POR ELECTROESPRAY (+) EN PLASMA DE PACÚ, EXPUESTO CRÓNICAMENTE POR VÍA DE LA ALIMENTACIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.



■ En verde Iones que presentan exaltación de la señal respecto al control ■ En Rojo Iones que presentan supresión de la señal respecto al control

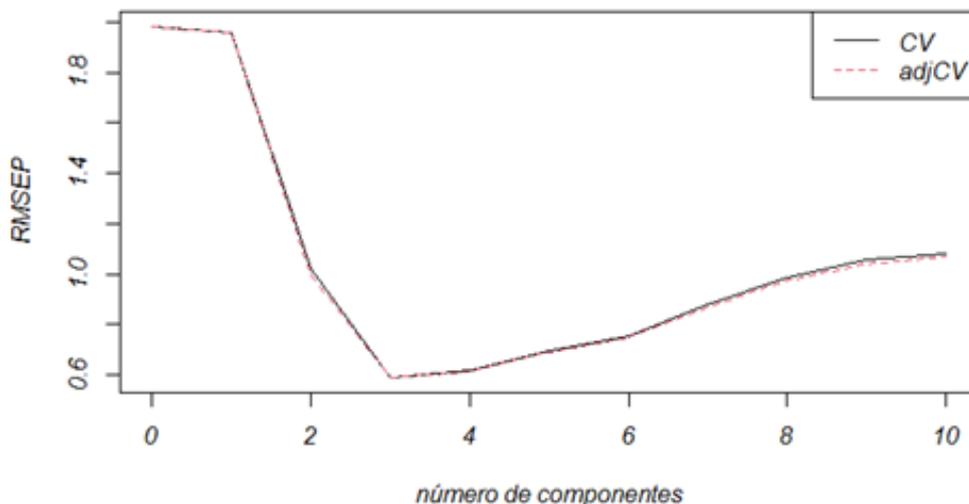
El valor p está representado por la intensidad del color de las esferas, La tasa de cambio (fold change) está representado por el radio de las esferas, El tiempo de retención cromatográfico está representado por la posición en el eje x . La relación masa-carga se representa por la posición en el eje Y .

FIGURA 4.2. VARIACIONES PRODUCIDAS EN EL PERFIL DE PICOS, DETECTADOS MEDIANTE IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (-) EN PLASMA DE PACÚ, EXPUESTO CRÓNICAMENTE POR VÍA DE LA ALIMENTACIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

Tabla de datos y modelo predictivo

El análisis exhaustivo de la tabla de datos indico que, de 7763 iones identificados en ionización negativa y 3445 iones identificados en ionización positiva, 53 iones en total cumplían con los criterios establecidos en la sección de materiales y métodos para ser seleccionados (17 en positivos y 36 en negativo). Los mismos se pueden observar en la tabla 4.2 (anexos). Con estos iones se realizó la construcción de un modelo basado en PLS-r (regresión por mínimos cuadrados parciales) que permita predecir exposición a concentraciones subletales de AFB₁, basado en los iones identificados.

El número de componentes principales para el modelo PLS, fue calculado mediante el grafico RMSEP para 10 componentes (figura 4. 3), cuyo valor mínimo fue de 0.5878, indicando que tres componentes serían suficientes para disminuir el error del modelo. El análisis gráfico del modelo, se observó que no existían diferencias entre la validación cruzada y validación cruzada corregida por sesgo.

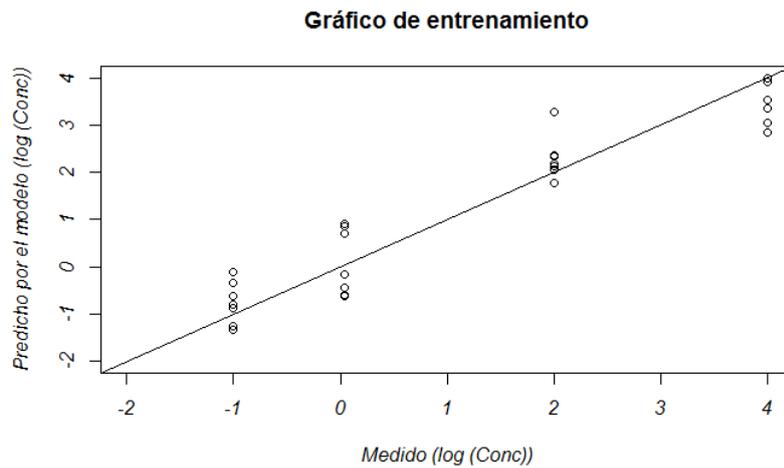


Modelo para 10 componentes mediante validación cruzada de LOO (dejando uno fuera). Línea negra representa modelo para validación cruzada, línea roja representa modelo para validación cruzada con corrección de sesgo.

FIGURA 4.3. GRÁFICO ERROR CUADRÁTICO MEDIO DE PREDICCIÓN (RMSEP) VS. NÚMERO DE COMPONENTES

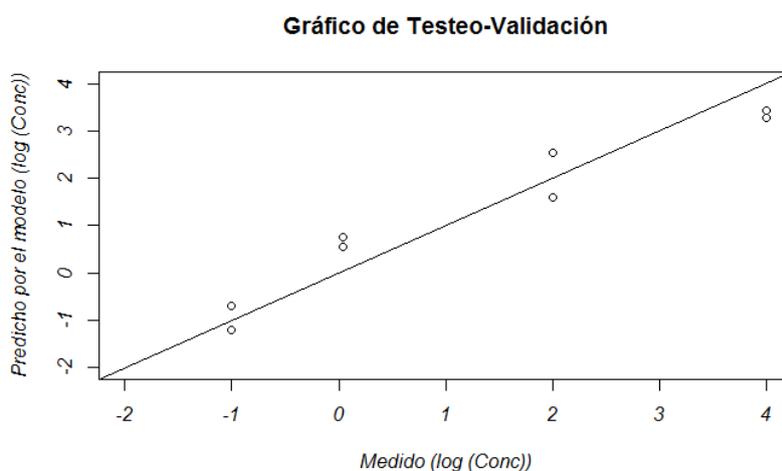
La varianza explicada por el modelo para cada componente fue: 60,88% para el componente 1, 14,75 para el componente 2 y 11,01 para el componente 3. Explicando los 3 componentes el 86,64% de la varianza,

La partición de los datos de trabajo permitió generar el modelo a partir de los datos de entrenamiento (Figuras 4. 4), para después comprobar su eficiencia con los datos reservados para el testeo-validación del modelo (Figura 4. 5). Los valores predichos por modelo ajustan en forma correcta con los valores medidos analíticamente en las muestras, pudiéndose utilizarse para predecir muestras incógnitas en la escala de concentraciones evaluadas.



*Valores medidos analíticamente vs. predichos por el modelo. Ejes en escala logarítmica
Línea= modelo PLSr*

FIGURA 4.4. GRÁFICO DE ENTRENAMIENTO DEL MODELO CON EL 80% DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS.

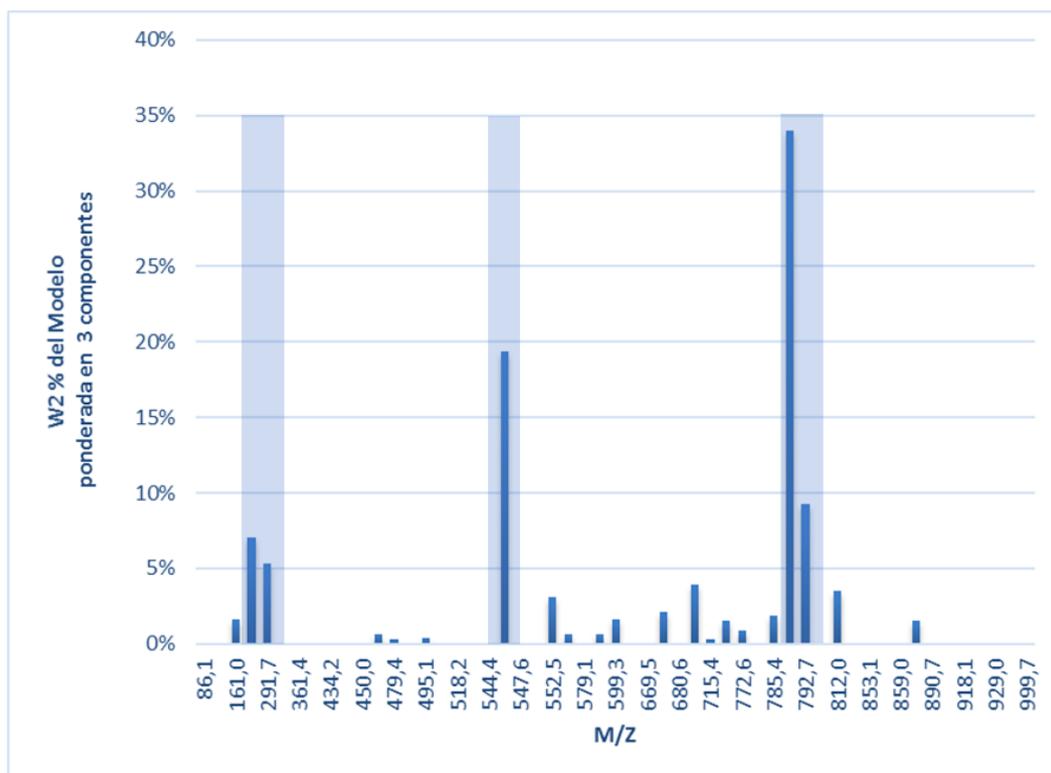


*Valores medidos analíticamente vs. Predichos por el modelo. Ejes en escala logarítmica
Línea= modelo PLSr obtenidos en gráfico entrenamiento*

FIGURA 4. 5. GRÁFICO DE TESTEO-VALIDACIÓN DEL MODELO CON EL 20% DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS.

Selección de posibles moléculas a utilizar como biomarcadores

De la evaluación del modelo, se detectaron aquellas variables que presentaron mejor relación con la concentración de exposición de AFB₁ en las 3 dimensiones elegidas, partir de los coeficientes de regresión. Como se observa en la Figura 4.6. y la tabla 4. 3., los iones que característicos elegidos como candidatos a biomarcadores, presentan relaciones carga/masa entre los intervalos de 500 a 800 dalton y 150 a 300 dalton. Explicando 5 iones el 74% de la variancia del modelo. De los iones seleccionados, solo uno, pudo ser identificado como metabolito putativo de las vías metabólicas alteradas en el modelo seleccionado del XCMS.



Cuadrados Rojos, indican variables relevantes >5%

FIGURA 4.6. GRÁFICO DE % ACUMULADO DEL PESO AL CUADRADO (w2) DE LAS VARIABLES, PONDERADO POR LA VARIANZA EXPLICADA, EN LAS 3 COMPONENTES DEL MODELO PLS-R PARA 53 VARIABLES (IONES).

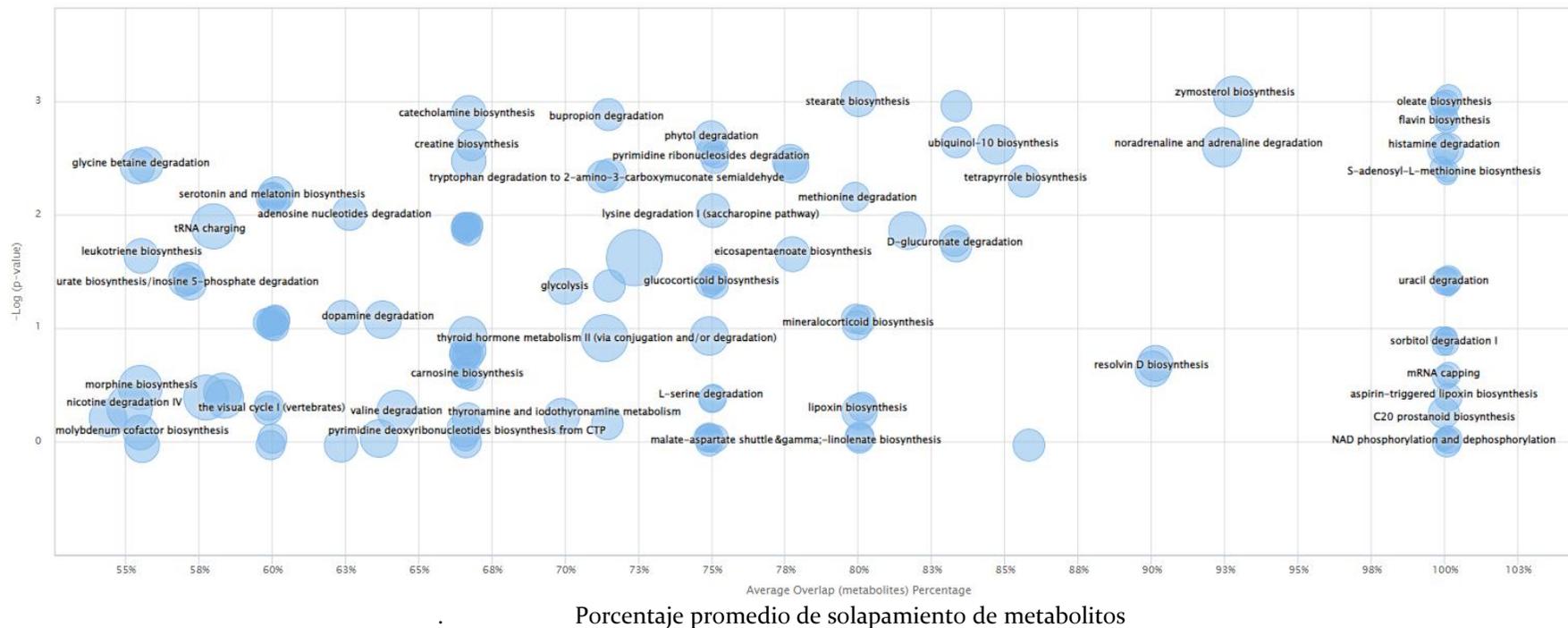
TABLA 4.3 IONES CANDIDATOS A BIOMARCADORES, EXTRAÍDOS DEL PLSR

Polaridad	Rel. Masa/carga (m/z)	Tiempo elusión (minutos)	W ₂ acumulado 3 componentes, ponderado por varianza	Respuesta ante exposición de AFB ₁	Identificación putativa de acuerdo con modelo xcms online
+	791,3	6,4	34%	Disminuye	No identificado
+	544,8	4,9	19%	Disminuye	No identificado
+	792,7	7,4	9%	Aumenta	No identificado
+	189,6	11,9	7%	Disminuye	3-hydroxy-N ⁶ ,N ⁶ ,N ⁶ -trimethyl-L-lysine L-carnitina biosíntesis M-NH ₃ +H[1+]
+	291,7	8,6	5%	Disminuye	No identificado
+	704,4	6,4	4%	Disminuye	
+	812,0	4,3	3%	Aumenta	
-	552,5	6,7	3%	Disminuye	
+	676,2	5,7	2%	Disminuye	
+	785,4	2,8	2%	Disminuye	
+	161,0	5,4	2%	Aumenta	
+	599,3	4,9	2%	Disminuye	
+	881,5	4,9	2%	Disminuye	
+	723,0	7,0	2%	Aumenta	
+	772,6	2,9	1%	Disminuye	
+	575,9	8,3	1%	Disminuye	
-	452,4	5,5	1%	Disminuye	
-	589,5	6,0	1%	Disminuye	

*Celdas Texto Rojo, indican variables relevantes según coeficientes de regresión.
Polaridad + (electrospray Positivo) Polaridad - (electrospray negativo)*

Rutas desreguladas

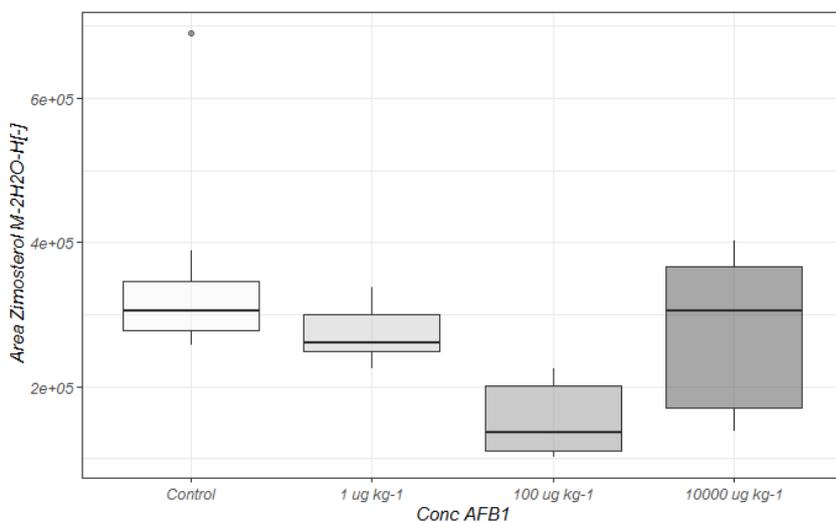
Las rutas metabólicas afectadas putativamente, se corresponden principalmente al metabolismo de lípidos y proteínas, siendo las más significativas estadísticamente la biosíntesis del zimosterol y la biosíntesis del estearato, cómo se puede observar en la figura 4.7, donde se observan las vías metabólicas posiblemente afectadas de acuerdo con las predicciones del software XCMS, utilizando como modelo Pez Cebra (*Danio rerio*). En el eje “y” se puede observar el log p negativo, mientras que el eje “x” indica el porcentaje de metabolitos detectados en el perfil metabolómico de los plasmas, sobre el total de la vía metabólica. La tabla anexo 4. 4. presenta un resumen de esta figura.



Los iones afectados fueron detectados mediante ionización por electro spray (- y +) y contrastado contra la base de datos de metabolitos METLIN, Metabolitos superpuestos vs. vía metabólica en el eje x Valores log p negativos en el eje y El radio de cada círculo representa el número de metabolitos en relación con el número de metabolitos representados por otros círculos

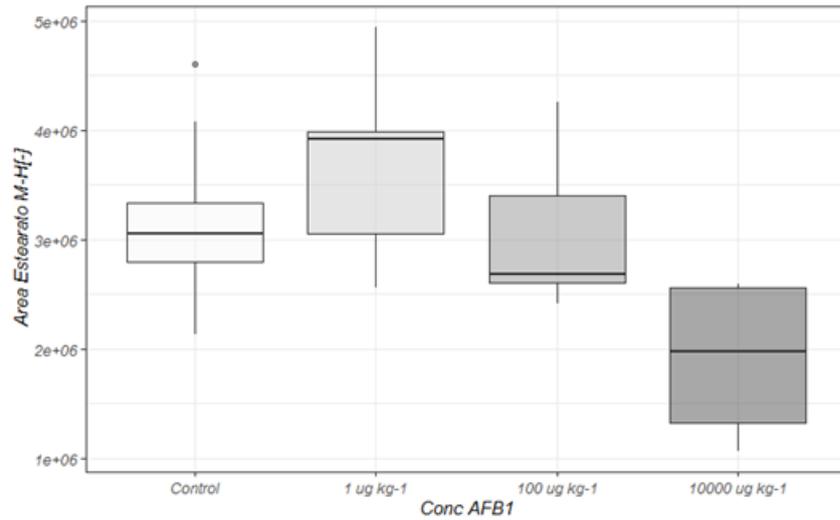
FIGURA 4.7. VÍAS METABÓLICAS POSIBLEMENTE AFECTADAS EN PLASMA DE PACÚ EXPUESTO CRÓNICAMENTE POR VÍA DE LA ALIMENTACIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

En particular, para los metabolitos detectados en la biosíntesis del zimosterol y la biosíntesis del estearato, los perfiles metabolómicos indicarían que la exposición a AFB₁ induce alteraciones sobre los peces de los grupos expuestos respecto a los del grupo control, pero como se puede observar en la Figuras 4.8 y 4.9, la respuesta a la AFB₁ no respondería de forma lineal. Por ello, el modelo propuesto en el PLS no incluyó a los iones de estas vías metabólicas.



Concentraciones de AFB₁ en el alimento eje “x” y áreas Aducto en el eje “y”; Las líneas de las cajas indican los valores medios, los bordes superior e inferior de la caja los percentiles 25 a 75, mientras que los bigotes muestran el rango de Áreas de todas las muestras.

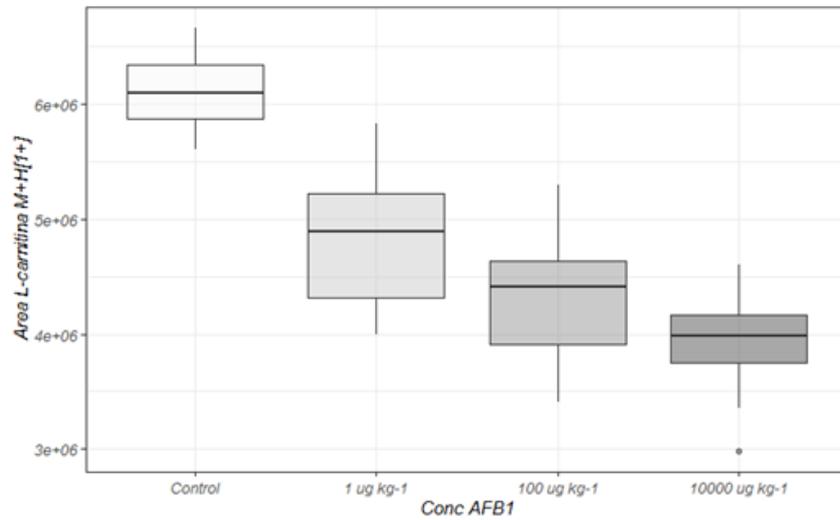
FIGURA 4.8. ÁREAS DE ADUCTOS ZIMOSTEROL [M-2H₂O-H]-, AFECTADOS PUTATIVAMENTE, EN PLASMA DE PACÚ, EXPUESTO CRÓNICAMENTE POR VÍA DE LA ALIMENTACIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁ DURANTE 70 DÍAS.



Concentraciones de AFB₁ en el alimento eje “x” y áreas aducto en el eje “y”; Las líneas de las cajas indican los valores medios, los bordes superior e inferior de la caja los percentiles 25 a 75, mientras que los bigotes muestran el rango de Áreas de todas las muestras.

FIGURA 4.9. ÁREAS DE ADUCTOS DE ESTEARATO [M-H]⁻ AFECTADOS PUTATIVAMENTE EN PLASMA DE PACÚ EXPUESTO CRÓNICAMENTE POR VÍA DE LA ALIMENTACIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁ DURANTE 70 DÍAS.

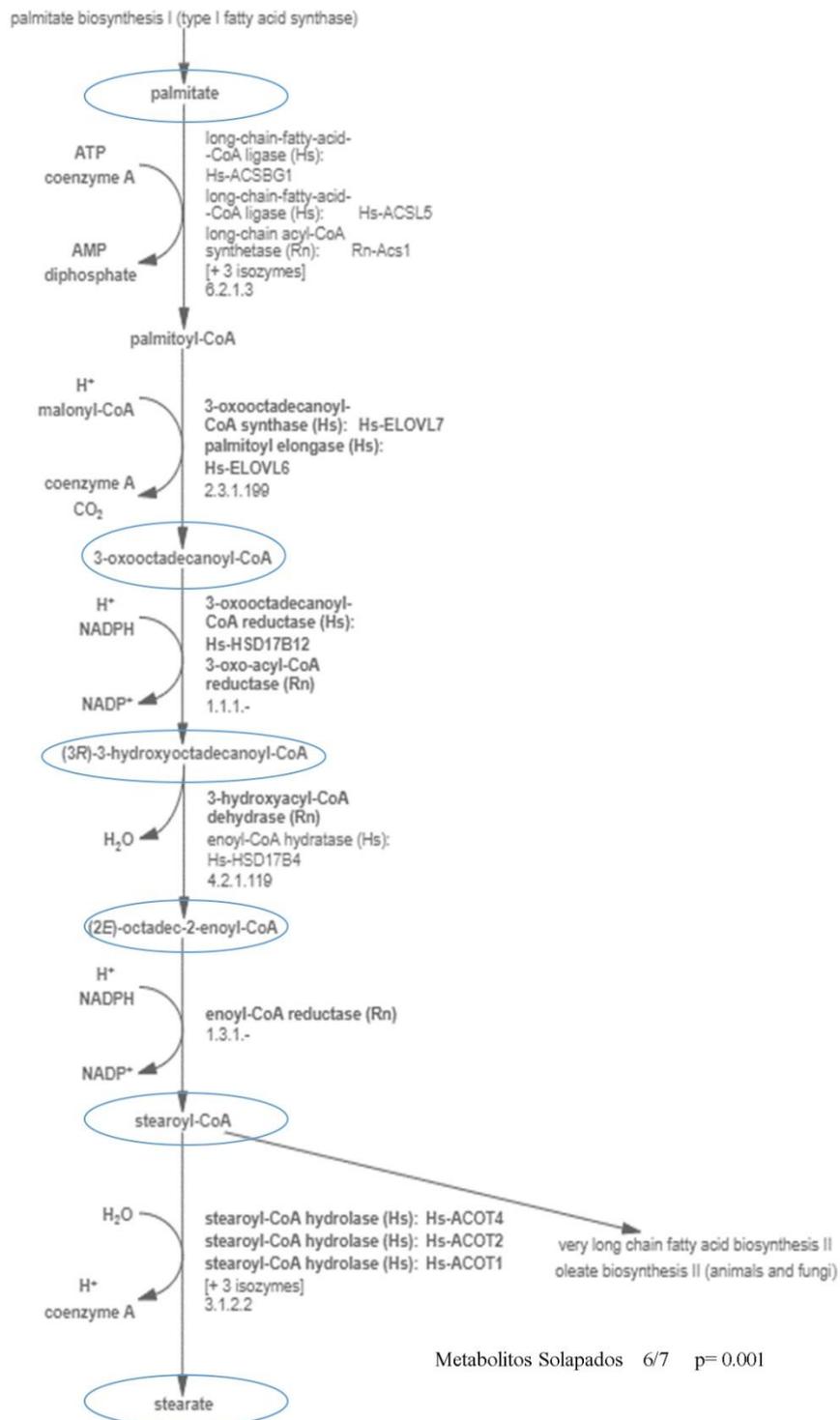
Por su parte, el modelo propuesto, indica que uno de los metabolitos que más aportan a la explicación del mismo corresponde a la biosíntesis de a L-carnitina, siendo esta vía metabólica estadísticamente significativa y la respuesta de los metabolitos presentan una respuesta monótona a la concentración de exposición como se puede observar en la figura 4.10.



Concentraciones de AFB₁ en el alimento eje “x” y áreas Aducto en el eje “y”; Las líneas de las cajas indican los valores medios, los bordes superior e inferior de la caja los percentiles 25 a 75, mientras que los bigotes muestran el rango de Áreas de todas las muestras

FIGURA 4.10. ÁREAS DE ADUCTOS L-CARNITINA [M+H]⁺, AFECTADOS PUTATIVAMENTE, EN PLASMA DE PACÚ, EXPUESTO CRÓNICAMENTE POR VÍA DE LA ALIMENTACIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁ DURANTE 70 DÍAS.

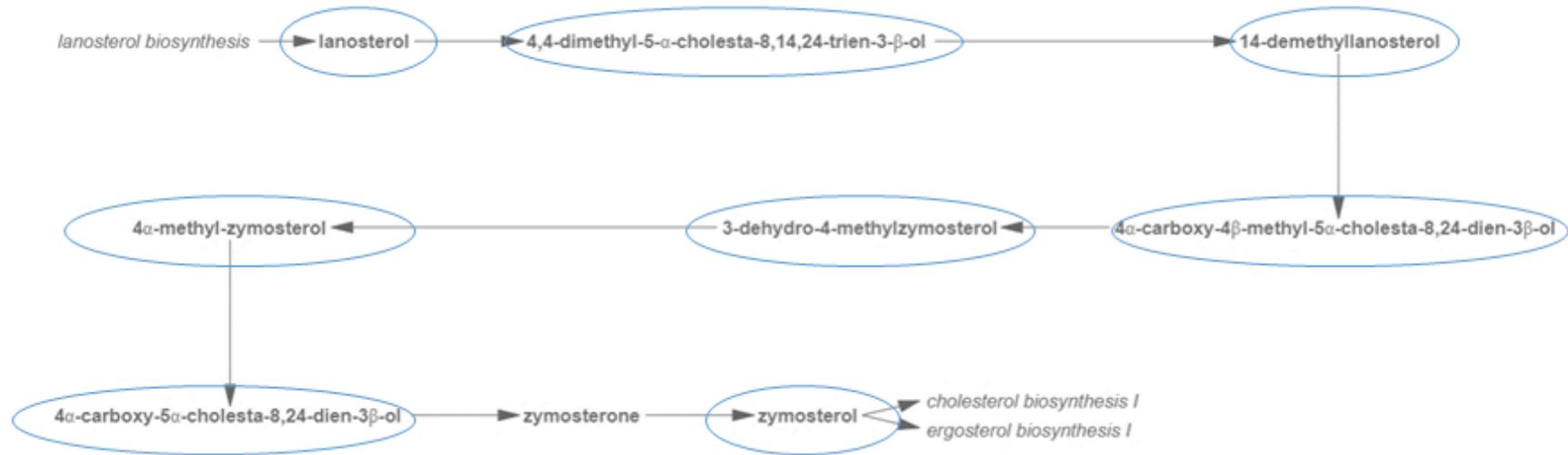
En las figuras 4.11, 4.12 y 4.13, se pueden observar los metabolitos que se solapan con las vías metabólicas mencionadas, resaltados con un círculo azul.



Círculos Azules: Metabolitos detectados en el perfil metabolómico alterado por AFB₁; Fuente Ruta Metabólica: <https://metacyc.org>

FIGURA 4.11. RUTA METABÓLICA DE LA BIOSÍNTESIS DEL ESTEARATO, AFECTADA PUTATIVAMENTE EN PLASMA DE PACÚ EXPUESTO CRÓNICAMENTE POR VÍA DE LA ALIMENTACIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

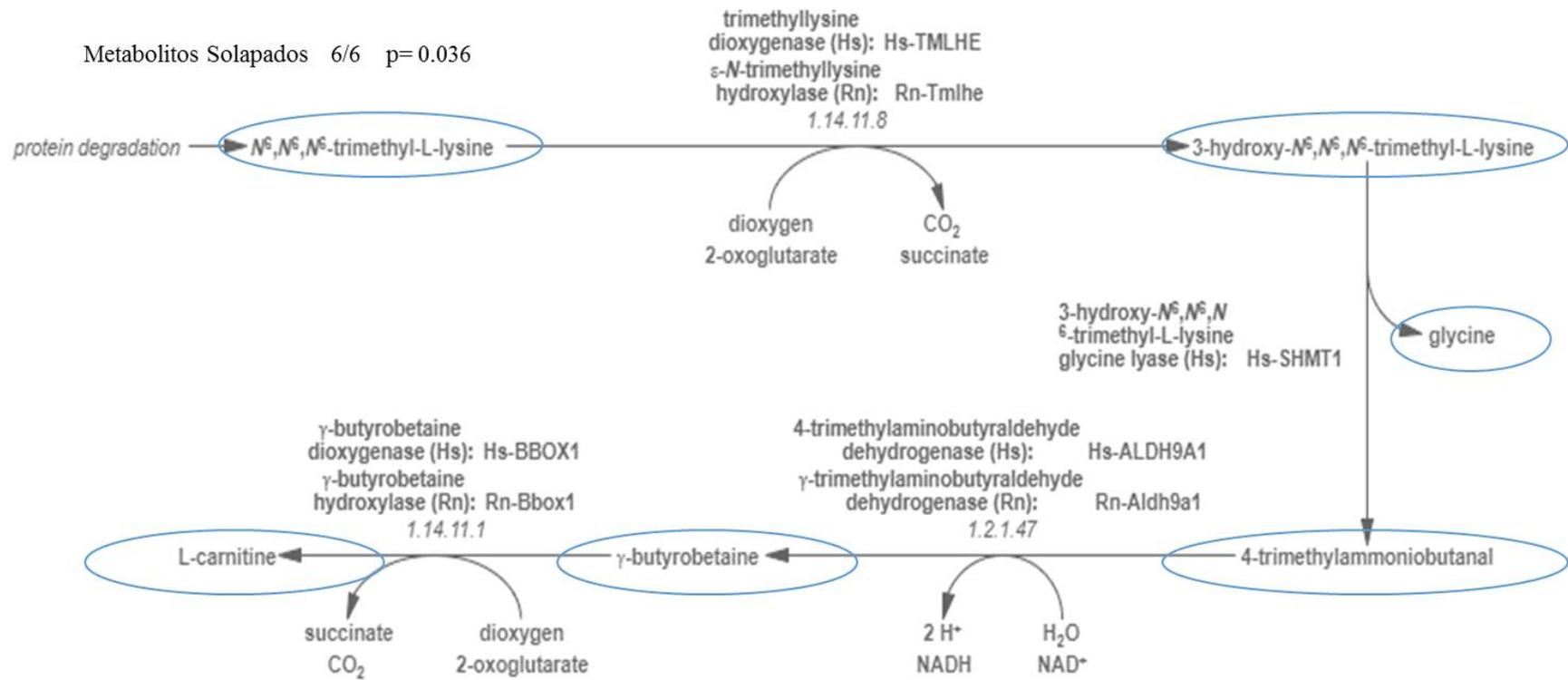
Metabolitos Solapados 8/9, $p=0,00086$



Círculos Azules: Metabolitos detectados en el perfil metabolómico alterado por AFB₁; Fuente Ruta Metabólica: <https://metacyc.org>

FIGURA 4.12. RUTA METABÓLICA DE LA BIOSÍNTESIS DEL ZIMOSTEROL AFECTADA PUTATIVAMENTE EN PLASMA DE PACÚ EXPUESTO CRÓNICAMENTE POR VÍA DE LA ALIMENTACIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁

Metabolitos Solapados 6/6 p=0.036



Círculos Azules: Metabolitos detectados en el perfil metabolómico alterado por AFB₁; Fuente Ruta Metabólica: <https://metacyc.org>

FIGURA 4.13. RUTA METABÓLICA DE LA BIOSÍNTESIS DE LA L-CARNITINA AFECTADA PUTATIVAMENTE EN PLASMA DE PACÚ EXPUESTO CRÓNICAMENTE POR VÍA DE LA ALIMENTACIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE AFB₁.

Discusión

De acuerdo los objetivos plantados en el presente capítulo, aquí se discuten los resultados en torno a los hallazgos más relevantes, estos fueron:

Perfil de metabolitos de bajo peso molecular, en plasma de Pacú, expuesto crónicamente por vía de la alimentación a concentraciones subletales de AFB₁

Estudios recientes demuestran la aplicación de la metabolómica como una herramienta para dilucidar los modos de acción bioquímicos de varios contaminantes (Deng et al. 2019). Owen (2008), define a un biomarcador, como la síntesis de la información cualitativa y cuantitativa que describe el efecto para la salud antes de la manifestación de los daños. En nuestro estudio, del perfil de metabolitos obtenidos mediante espectrometría de masas, se ha observado una gran cantidad de iones, tanto en modo de ionización negativo como positivo, que presentaron cambios en respuesta a la exposición de AFB₁ respecto al tratamiento control, siendo estos potenciales biomarcadores de la exposición y/o el efecto inducido por la toxina.

La detección de biomarcadores basadas en metabolómica resulta una herramienta útil y versátil para caracterizar los riesgos de enfermedades y los mecanismos asociados con contaminantes (Deng et al. 2019).

De acuerdo con los resultados, se especula que los iones detectados en el plasma, que presentaron diferencias respecto al grupo control (Figuras 4. 1. y 4. 2.), podrían ser propuestos como biomarcadores para identificar Pacúes que estuvieron expuestos a AFB₁ a través de la alimentación. En la separación cromatográfica analizada mediante ESI(-), se observa que los iones que presentan cambios significativos entre los tratamientos se hallan principalmente en los intervalos de elusión de 1-3 minutos y de 6-10 minutos, por lo que es presumible que, debido a la capacidad de ceder cargas y los tiempos de elusión, estos grupos representen

ácidos orgánicos y compuestos relacionados (David et al. 2014, Wegner et al. 2017). Por otra parte, en la separación cromatográfica analizada mediante ESI(+), se observa que los iones que presentan cambios significativos entre los tratamientos se hallan principalmente en el intervalo de elusión de 5-8 minutos, corresponderían, por capacidad de aceptar cargas y tiempo de elusión, a moléculas orgánicas de baja polaridad o con carga neutra en la fase móvil utilizada como aminoácidos libres, péptidos pequeños y triglicéridos (Karuna 2015).

Ninguno de los iones detectados se correspondió con los iones característicos de los residuos de AFB₁, esto puede deberse a que, al ser incorporados por el alimento, según lo descrito por Rushing and Selim (2019) la AFB₁ es biotransformada por la CYP450 a AFBO, donde tiene entre otros tres destinos principales: la hidrólisis de AFBO cuyo producto puede unirse a proteínas plasmáticas y su producto mayoritario es AFB₁-albúmina, la aducción al ADN que conduce a AFB₁-N 7-adtuctos de guanina y la conjugación con glutatión que conduce a la formación de AFB₁-GSH. Debido a que la técnica utilizada para la preparación de las muestras elimina por precipitación las proteínas plasmáticas y la rápida metabolización de la AFB₁, es probable que el resto de los metabolitos en la circulación general posea concentraciones tan bajas, que no son detectables en el modo de barrido utilizado para el análisis metabolómico.

Cheng et al. (2017) trabajando con cabras lecheras alimentadas de dieta contaminadas con AFB₁ (20 µg kg⁻¹ y 40 µg kg⁻¹ AFB₁), encontraron cambios significativos en los perfiles de plasma en relación con los perfiles de control, que afectaron significativamente el perfil de lípidos, y los contenidos de acetato, fenilalanina y colina. Por su parte Rotimi et al. (2017) trabajando con ratas, reportaron que la exposición aguda a AFB₁ (1000 µg kg⁻¹), aumentó los niveles de colesterol, triglicéridos y presento una disminución de la concentración de fosfolípidos en plasma. Por otro lado, Zuberi et al. (2019) en perfiles metabólicos de embriones de pez cebra expuestos a AFB₁ encontraron, por un lado, un aumento significativo de varios aminoácidos libres, ácidos grasos y metabolitos asociados con la energía celular, como

producto de la glucólisis anaeróbica, incluidos ATP, NADH, NAD⁺ y lactato, y por otro, una reducción de los niveles de glucosa y estructuras de la membrana celular como colina o N-acetil glicoproteínas, además del glutatión (GSH), como mecanismo de detoxificación de fase II.

El análisis putativo del XCMS online, de las vías metabólicas indica que los metabolitos que presentaron variaciones significativas corresponden a metabolismo de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos biliares. Coincidiendo estas vías, con las reportadas los autores previamente citados.

Biomarcadores y modelización

La metodología utilizada de XCMS-Análisis multivariado, resulto adecuada para identificar y reducir, en función de su relevancia, metabolitos/iones característicos, que presentaron una respuesta a la concentración de AFB₁, resultando posibles candidatos a ser utilizados como biomarcadores de exposición/efecto.

Por su parte el análisis de la respuesta de las disrupciones metabólicas a nivel de muchos metabolitos plasmático condice con lo reflejado con la respuesta descrita para las enzimas hepáticas en el capítulo previo. En virtud de los iones/metabolitos que respondieron a la exposición, una gran cantidad de vías metabólicas se verían alteradas por los efectos de la AFB₁ y en tal sentido, se identificaron alguno de los iones putativos de moléculas correspondientes a estas vías.

Al evaluar los mismos (Figuras 4.8 y 4.9), no cumplían con los parámetros establecidos para el modelo propuesto, por lo que estos no fueron seleccionados para generar el modelo multivariado. Esto, no indicaría que los iones “no seleccionados”, no pudieran ser posibles biomarcadores de exposición, sólo que no guardaban una relación monotónica entre la concentración de AFB₁ y su respuesta, lo que dificulta su interpretación.

En base a los criterios establecidos, se pudieron detectar 5 iones, que representan el mayor peso en los componentes del modelo desarrollado, uno de ellos correspondería a la ruta metabólica de la L-carnitina. El papel de la L-carnitina en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial interna de peces, fue descrito por Tocher (2003). Gao et al. (2022), trabajando sobre ratones expuestos a AFM₁ y ocratoxinas, detectaron el aumento del nivel de fosfolípidos y la disminución del nivel de L-carnitina sobre el perfil metabólico del suero. Otros autores han demostrado la función de la L-carnitina en la reducción de la toxicidad de micotoxinas, como la ooxina T₂ en ratas (Moosavi et al. 2016) o aflatoxinas en codornices (Citil et al. 2005). Por su parte, Yatim and Sachan (2001), observaron en hepatocitos de ratas, que la L-carnitina altera la unión de la aflatoxina al ADN, observando una correlación lineal negativa entre la dosis de L-carnitina y la formación de aductos AFB₁-epóxido-ADN. Los autores indican, que la L-carnitina, parece interferir con la bioactivación de AFB₁ y la unión de AFB₁-epóxido al ADN, mediante la promoción de la unión de AFB₁ a las proteínas plasmáticas, disminuyendo el potencial cancerígeno y hepatotóxico de AFB₁. También, es conocido que la L-carnitina es utilizada como suplemento en la nutrición acuícola debido a la capacidad de mejorar el crecimiento y aumentar la tasa de utilización de lípidos en animales acuáticos. Por lo que es de esperar que una disminución de la concentración de L-carnitina endógena afecte el metabolismo de lípidos como se observa en los perfiles metabólicos, y que las concentraciones de L-carnitina en plasma disminuyan ante la exposición a AFB₁, coincidiendo esto con lo reportado por Yatim and Sachan (2001), Citil et al. (2005) y Gao et al. (2022)

Como perspectiva se espera en el futuro, se detecte la identidad del resto de los iones identificados por el modelo como potenciales biomarcadores para detectar la respuesta a la AFB₁ en la especie durante exposiciones a través de la dieta.

Conclusiones parciales

En el presente capítulo se evaluó el efecto de la exposición a AFB₁ sobre el perfil metabólico plasmático del pacú y se detectaron las principales vías que podrían estar siendo afectadas por el consumo de alimento balanceado contaminado con AFB₁, como así también iones que podrían ser utilizados como biomarcadores. Las principales conclusiones alcanzadas son:

- La utilización de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, permitió detectar, en muestras de plasma, una gran cantidad de moléculas que modificaron su concentración en respuesta al consumo crónico de AFB₁ alterando el perfil metabólico plasmático del Pacú.
- Las variaciones producidas en el perfil metabólico del plasma dependieron de la concentración de toxina, siendo las vías metabólicas de lípidos las que parecieran ser las más afectadas. La interacción entre la AFB₁ y la L-carnitina, explicaría este efecto.
- La proporción de estas alteraciones permitió generar un modelo matemático que permitiría identificar la exposición crónica a AFB₁, mediante espectrometría de masas, aún en concentraciones inferiores a los límites de detección habituales, según lo observados en otros capítulos.
- Se pudieron identificar 5 moléculas de polaridades intermedias, que pudieran ser utilizadas como biomarcadores en el futuro, identificándose la L-carnitina, como biomarcadores putativos no destructivos.

DISCUSIÓN GENERAL

La contaminación de los alimentos con micotoxinas se ha convertido en un grave problema mundial de seguridad alimentaria. Además de las pérdidas económicas sobre la producción, las micotoxinas representan un problema para la salud humana y animal al ser consumidas a través de alimentos y piensos contaminados (Mirza Alizadeh et al. 2021). Por sus características hepatotóxicas, las aflatoxinas son de las más relevantes a considerar (Coppock et al. 2018).

Los efectos negativos de los residuos de las aflatoxinas para el medio ambiente acuático son cada vez más reconocidos en la acuicultura. Para minimizar el riesgo de exposición a las aflatoxinas, es esencial una estrecha cooperación entre, los productores, los consumidores y gobiernos (Dirican 2015). Si bien existen numerosos trabajos científicos publicados que han contribuido al conocimiento sobre la presencia, efectos y herramientas para mitigar la problemática de la presencia de AFB₁ en la producción de alimentos, en particular en acuicultura, la mayoría de los trabajos tratan sobre aquellas especies que son consideradas relevantes para el mercado internacional, como Salmónidos o tilapia, generando una brecha de conocimiento sobre especies nativas en países en desarrollo.

La información disponible sobre la bioacumulación y toxicidad, a niveles letales y subletales, agudos y crónicos, de las aflatoxinas para las especies de peces nativos utilizados en la acuicultura en Argentina es escasa y advierte la necesidad de generar información que permita un mejor conocimiento de los riesgos potenciales de estos compuestos tanto para los propios peces, como para la salud de los consumidores. Estos valores son necesarios para el desarrollo de políticas públicas basadas en datos científicos (CODEX 2013).

En la presente tesis se relevó la ocurrencia y las concentraciones de aflatoxinas en alimentos balanceados utilizados en acuicultura en la región, junto a la percepción del productor sobre la problemática. A partir de los datos obtenidos, se diseñaron estudios para

evaluar los efectos del consumo de aflatoxina en Pacú, especie nativa de mayor relevancia para la producción argentina (Carciofi and Rossi 2021). Los mismos estuvieron dirigidos a estudiar la toxicocinética y toxicodinámica de la AFB₁ y analizar alteraciones en el perfil metabolómico con miras de descubrir nuevos biomarcadores que puedan ser útiles para detectar exposición y/o efectos adversos inducidos por esta micotoxina. Los resultados obtenidos, han permitido que la presente tesis sea una de las primeras contribuciones a nivel nacional que tratan la acumulación de residuos de aflatoxinas y los efectos sobre parámetros productivos y biológicos del pacú causados por el consumo de alimento contaminado con dicha toxina.

Los resultados han demostrado que las concentraciones de aflatoxinas halladas en tejido de los peces alcanzan un valor máximo de residuos de AFB₁ y AFM₁ independientemente de la dosis, aunque el tiempo para alcanzar este equilibrio dependió de la dosis de AFB₁ en el alimento y del tejido estudiado. La metabolización de la toxina fue extremadamente rápida, en comparación con contaminantes persistentes como los PCBs (Hou et al. 2019) y siendo eliminada rápidamente dentro de las primeras 72 h de alimentación libre de AFB₁.

Las concentraciones de AFB₁ y AFM₁ encontradas en la fracción comestible (músculo) fueron inferiores a las referencias de la reglamentación internacional para otros alimentos. Sin embargo, las concentraciones de residuos de aflatoxinas encontradas en hígado, podrían exceder los límites máximos permitidos estipulados para otros alimentos, dependiendo del tiempo de exposición y la concentración de AFB₁ en el alimento.

Uno de los aportes importantes de esta tesis, ha sido que por primera vez se reporta sobre la acumulación de residuos de aflatoxinas en una especie nativa como el Pacú, estableciéndose valores máximos de referencia en las condiciones ensayadas. Siendo un insumo indispensable para los organismos de control de la seguridad alimentaria (CODEX 2006).

Los resultados de los parámetros productivos y biológicos evaluados indicaron, que, de acuerdo con las dosis de AFB₁ encontradas en los alimentos balanceados relevados en la región, no sería esperable, detectar efectos letales agudos producto del consumo de alimento contaminado con AFB₁ en el periodo evaluado (70 días), esto, considerando que se ensayaron concentraciones 500 veces superiores a las detectadas en los alimentos balanceados y no se detectaron efectos letales. Por su parte Michelin et al. (2021a), reportaron efectos letales y pérdida de peso a concentración de exposición de 50 µg kg⁻¹ durante 180 días de exposición, por lo que debería considerarse que tiempos más prolongados a los evaluados pueden inducir efectos letales.

A nivel histológico y bioquímico, exposiciones cortas a la toxina (30 días o menos) y dosis bajas (1 µg kg⁻¹), presenta un efecto estimulante a nivel de las respuestas enzimáticas y los parámetros de desempeño biológico. Contrariamente, la exposición crónica (50 o más días) a concentraciones comprendidas entre 1 y 10000 µg kg⁻¹ de AFB₁ causó un efecto inhibitorio y tóxico, mostrando una respuesta de tipo hormética en forma de “U” invertida. Estas alteraciones se correspondieron con daño hepático por aflatoxicosis y enfermedades hepáticas como hígado graso no alcohólico (HGNA/NAFLD). Los resultados indicaron que estas alteraciones impactarían directamente sobre modificaciones en la composición centesimal de la carne, alterando la calidad del producto. Ello fue además detectado por el análisis del perfil metabolómico del plasma.

El análisis, de los perfiles de metabolitos plasmáticos de los ensayos de exposición, presentaron una gran cantidad moléculas con variaciones tanto negativas como positivas, en sus concentraciones respecto a los controles. Para el análisis de estos datos, la herramienta aplicada consistió en: i) la separación cromatográfica seguida de espectrometría de masas, ii) procesamiento de los espectros mediante el software XCMS, iii) comparación de los resultados contra bases de datos de metabolitos y vías metabólicas y vi) análisis multivariado e interpretación biológica de los resultados obtenidos. La estrategia resultó adecuada para

identificar y reducir en función de su relevancia y comportamiento, metabolitos/iones característicos que presenten una respuesta a la concentración de exposición a AFB₁ como posibles candidatos a ser utilizados como biomarcadores de exposición/efecto y permitió generar un modelo matemático capaz de detectar la exposición crónica a AFB₁ del Pacú, mediante el análisis de plasma por espectrometría de masas.

Entre los 53 metabolitos que componen el modelo, 5 de ellos explicaron el 74% de la varianza del modelo, pudiendo ser utilizados como biomarcadores en futuros estudios. En particular, se pudo identificar uno solo de estos 5 metabolitos, correspondiéndose con un metabolito intermedio de la biosíntesis L-carnitina. Los efectos de la AFB₁ sobre la disminución de L-carnitina en plasma, fueron reportados para otros animales como ratas (Yatim and Sachan 2001), codornices (Citil et al. 2005) y ratones (Gao et al. 2022).

El análisis de las vías metabólicas indicó que las más afectadas fueron las del metabolismo de lípidos. La interacción entre la AFB₁ y la L-carnitina, explicaría este efecto. Dado que la L-carnitina es esencial para el transporte de ácidos grasos (Tocher 2003), la disminución de este metabolito por la interacción con la AFB₁ explicaría los efectos encontrados a nivel histológico y composición centesimal de las carnes. El uso de la L-carnitina como suplemento en la nutrición acuícola para mejorar la utilización de lípidos en animales acuáticos es consistente con esta hipótesis (Li et al. 2019).

CONCLUSIÓN GENERAL

En la presente tesis, se detectó la presencia de aflatoxinas en los alimentos balanceados utilizados en circuitos productivos de la acuicultura del pacú y se pudieron describir los efectos de la AFB₁ sobre la especie a nivel productivo y de seguridad alimentaria, respecto a la incidencia de los residuos en la fracción comestible.

A su vez, se lograron identificar caracterizar respuestas biológicas útiles para evaluar los efectos tóxicos de la AFB₁ para la especie, tanto a nivel letal, subletal (bioquímico e histológico) como su impacto en aspectos productivos.

El empleo de herramientas metabolómicas permitió la comprensión de posibles mecanismos que permitan explicar los efectos detectados a nivel bioquímico e histológico y la identificación de iones plasmáticos característicos que presentan respuestas lineales con la concentración de AFB₁, que se comportan como buenos biomarcadores específicos de exposición y efecto y que señalan las rutas metabólicas afectadas, abriendo futuras líneas de investigación sobre el tema.

Por consiguiente, las principales conclusiones que se obtuvieron fueron:

- Se detectó una importante incidencia de aflatoxinas en los alimentos destinados a acuicultura en la región, presentando concentraciones 10 veces superiores a reportado en los insumos de la misma región utilizados para su preparación.
- La incorporación, metabolización y eliminación de la AFB₁ se produce rápidamente, por consiguiente, los valores máximos de residuos en músculo se alcanzan independientemente de la dosis y son relativamente bajos, siendo inferiores a los exigidos por la reglamentación internacional para alimentos. Además, la toxina y su metabolito (AFM₁), buscados por los organismos de control, son eliminados dentro de las 72 h de alimentación libre de toxinas.

- No se pudo detectar una dosis letal para la especie por el consumo de AFB₁, por lo que de acuerdo con las concentraciones encontradas en los alimentos en condiciones normales de cría no serían esperables mortalidades producto del consumo de alimento contaminado con la toxina. Ello coloca al pacú entre las especies tolerantes a los efectos tóxicos de la AFB₁, siendo los efectos de la toxina mínimos en comparación los reportados para otras especies destinadas al consumo humano, como ser pollo o cerdo.
- Se observaron efectos a nivel histológico y bioquímico que indican que los peces son subletalmente afectados por la toxina, observándose síntomas característicos a enfermedades hepáticas como hígado graso no alcohólico (HGNA/NAFLD). Tales efectos no afectaron el desempeño biológico de los peces, dentro de los tiempos ensayados, pero sí las propiedades de su carne.
- El análisis del metaboloma plasmático permitió identificar que las vías metabólicas de los lípidos serían afectadas por el consumo de AFB₁ y la identificación de intermediarios de la biosíntesis de L-carnitina en el modelo matemático desarrollado, explicaría la acumulación de lípidos a nivel hepático y muscular.
- Las variaciones producidas en el perfil metabolómico del plasma mostraron numerosos metabolitos afectados que el uso de las herramientas bioinformáticas y la espectrometría de masa permitieron identificar metabolitos que podrían ser utilizados como biomarcadores no destructivos en futuros relevamientos de estaciones de acuicultura.

BIBLIOGRAFÍA

- Aas, T. S., M. Oehme, M. Sørensen, G. He, I. Lygren, and T. Åsgård. 2011. Analysis of pellet degradation of extruded high energy fish feeds with different physical qualities in a pneumatic feeding system. *Aquacultural Engineering* **44**:25-34.
- Acuña Reyes, M. J. 2013. Peces de cultivo, composición, comparación con carnes de consumo habitual. Ventajas del consumo de pescados. La revista científica de la Asociación Argentina de Dietistas y Nutricionistas **31**,:26-30.
- Akins, R. E., and R. S. Tuan. 1995. Ultrafast protein determinations using microwave enhancement. *Molecular biotechnology* **4**:17.
- Al-Souti, A., W. Gallardo, M. Claereboudt, and O. Mahgoub. 2019. Attractability and palatability of formulated diets incorporated with chicken feather and algal meals for juvenile gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture Reports* **14**:100199.
- Alinezhad, S. F., M; Falahatkar, B; Nabizadeh, R; Davoodi, D 2017. Effects of nanostructured zeolite and aflatoxin B₁ in growth performance, immune parameters and pathological conditions of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish shellfish immunology* **70**:648-655.
- Alvarez, E., M. Cardoso, G. Depetris, C. Castellari, D. Cristos, M. D. Montiel, and R. Bartosik. 2019. Storage of WDGS under hermetic and non-hermetic conditions: Effect on sensory properties, microorganisms, mycotoxins and nutritional value. *Journal of Stored Products Research* **80**:65-70.
- Anater, A., C. M. T. D. Araújo, D. C. C. Rocha, A. Ostrensky, J. R. Engracia Filho, D. R. Ribeiro, and C. T. Pimpão. 2020. Evaluation of growth performance, hematological, biochemical and histopathological parameters of *Rhamdia* quelen fed with a feed artificially contaminated with aflatoxin B₁. *Aquaculture Reports* **17**:100326.
- Anater, A., L. Manyes, G. Meca, E. Ferrer, F. B. Luciano, C. T. Pimpão, and G. Font. 2016. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. *Aquaculture* **451**:1-10.
- Anh Tuan, N., J. M. Grizzle, R. T. Lovell, B. B. Manning, and G. E. Rottinghaus. 2002. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B₁. *Aquaculture* **212**:311-319.
- Arab, J. P., K. A. Schalper, and M. Arrese. 2014. Clasificación histológica para hígado graso no alcohólico: NAFLD activity score (NAS). *Gastroenterol Latinoam* **25**:308-313.
- Arana, S., V. A. Alves, M. Sabino, Y. A. Tabata, S. Nonogaki, M. L. Zaidan-Dagli, and F. J. Hernandez-Blazquez. 2014. Immunohistochemical evidence for myofibroblast-like cells associated with liver injury induced by aflatoxin B₁ in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Pathology* **150**:258-265.
- Arroyo-Manzanares, N., J. F. Huertas-Perez, L. Gamiz-Gracia, and A. M. Garcia-Campana. 2015. Simple and efficient methodology to determine mycotoxins in cereal syrups. *Food Chemistry* **177**:274-279.
- Asbaghi, O., H. Emamat, M. R. Kelishadi, and A. Hekmatdoost. 2020. The association between nuts Intake and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) risk: a case-control study. *Clinical Nutrition Research* **9**:195.
- Ayyat, M., G. Abd Rhman, H. El-Marakby, H. Mahmoud, and A. Hessian. 2013. Reduction the aflatoxin toxicity in Nile tilapia fish. *Egyptian Journal of Nutrition Feeds* **16**:469-479.
- Ayyat, M. S., A. M. N. Ayyat, A. A. Al-Sagheer, and A. E.-A. M. El-Hais. 2018. Effect of some safe feed additives on growth performance, blood biochemistry, and bioaccumulation of aflatoxin residues of Nile tilapia fed aflatoxin-B₁ contaminated diet. *Aquaculture* **495**:27-34.
- Bailey, G. S., D. E. Williams, J. S. Wilcox, P. M. Loveland, R. A. Coulombe, and J. D. Hendricks. 1988. Aflatoxin B₁ carcinogenesis and its relation to DNA adduct formation and adduct persistence in sensitive and resistant salmonid fish. *Carcinogenesis* **9**:1919-1926.
- Barbosa, T., C. Pereyra, C. Soleiro, E. Dias, A. Oliveira, K. Keller, P. Silva, L. Cavaglieri, and C. Rosa. 2013. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. *International Aquatic Research* **5**:1-9.
- Bardach, J. E. 1997. *Aquaculture, pollution and biodiversity. Sustainable Aquaculture*. New York, John Wiley & Sons, Inc, 87-99.

- Barug, D., van Egmond, H. P., López-García, R., van Osenbruggen, W. A., & Visconti, A. (2004). Meeting the mycotoxin menace: Proceedings of the 2nd World Mycotoxin Forum held in Nordwijk, the Netherlands, 17-18 February 2003. Wageningen Academic Publishers.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. [arXiv:1406.5823](https://arxiv.org/abs/1406.5823) <https://doi.org/10.48550/arXiv.1406.5823>
- BCR. 2020. Statistical Annuary Bolsa de Comercio de Rosario.
- Bedoya-Serna, C. M., E. C. Michelin, M. M. Massocco, L. C. S. Carrion, S. H. S. Godoy, C. G. Lima, P. S. Ceccarelli, G. S. Yasui, G. E. Rottinghaus, R. L. M. Sousa, and A. M. Fernandes. 2018. Effects of dietary aflatoxin B₁ on accumulation and performance in matrinxa fish (*Brycon cephalus*). PLoS ONE **13**:e0201812.
- Beger, R. C., Thomas. 2011. Metabolomics data and the biomarker qualification process. *Metabolomics* **8**:2-7.
- Bermúdez, A., A. Muñoz-Ramírez, and G. Wills. 2012. Evaluación de un sistema de alimentación orgánico sobre el desempeño productivo de la tilapia nilótica, (*Oreochromis niloticus*), cultivada en estanques de tierra. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* **59**:165-175.
- Boorman, G. A., S. Botts, T. E. Bunton, J. W. Fournie, J. C. Harshbarger, W. E. Hawkins, D. E. Hinton, M. P. Jokinen, M. S. Okihiro, and M. Wolfe. 1997. Diagnostic criteria for degenerative, inflammatory, proliferative nonneoplastic and neoplastic liver lesions in medaka (*Oryzias latipes*): consensus of a National Toxicology Program Pathology Working Group. *Toxicologic Pathology* **25**:202-210.
- Boyd, C., and A. A. McNevin. 2022. Overview of aquaculture feeds: global impacts of ingredient production, manufacturing, and use. Pages 3-28 *Feed and feeding practices in aquaculture*. Elsevier.
- Brande, M. 2019. Bioeconomic viability of fish farms family for producing the pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in the Atlantic Forest area of São Paulo, Brazil. *Custos e @gronegocio* **15**:2-18.
- Bu, X., A. Chen, X. Lian, F. Chen, Y. Zhang, I. Muhammad, X. Ge, and Y. Yang. 2017. An evaluation of replacing fish meal with cottonseed meal in the diet of juvenile Ussuri catfish *Pseudobagrus ussuriensis*: Growth, antioxidant capacity, nonspecific immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* **479**:829-837.
- Calabrese, E. J. 2008. U-Shaped Dose Response in Behavioral Pharmacology: Historical Foundations. *Critical Reviews in Toxicology* **38**:591-598.
- Calabrese, E. J. 2010. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Human & Experimental Toxicology* **29**:249-261.
- Camiletti, B., A. Torrico, M. Maurino, D. Cristos, C. Magnoli, E. Lucini, and M. Pecci. 2017. Fungal screening and aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi* isolated from pre-harvest maize ears grown in two Argentine regions. *Crop Protection* **92**:41-48.
- Cançado, G. M., V. E. De Rosa, J. H. Fernandez, L. G. Maron, R. A. Jorge, and M. Menossi. 2005. Glutathione S-transferase and aluminum toxicity in maize. *Functional Plant Biology* **32**:1045-1055.
- Carciofi, I., and L. Rossi. 2021. Acuicultura en Argentina: red de actores, procesos de producción y espacios para el agregado de valor. . En búsqueda del impulso exportador para los productos acuícolas. Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación.
- Carriquiriborde, P. 2020. Metabolic profiling of biofluids in fish for identifying biomarkers of exposure and effects for assessing aquatic pollution. Pages 65-89 *Environmental Metabolomics*. Elsevier. ISBN: 978-0-12-818196-6
- Castañares, E., M. Martínez, D. Cristos, D. Rojas, B. Lara, S. Stenglein, and M. I. Dinolfo. 2019. *Fusarium* species and mycotoxin contamination in maize in Buenos Aires province, Argentina. *European Journal of Plant Pathology* **155**:1265-1275.
- CCAC. 2005. Guidelines on: The care and use of fish in research, teaching, and testing. *in* G. Committee., Batt, J., Bennett-Steward, K., Couturier, C., Hammell, L., Harvey-Clark, C., Kreiberg, H. & Griffin, G.
- Centellegher, C. G. 2019. Evaluación de la capacidad de retención de aflatoxinas utilizando bentonitas comerciales de la Norpatagonia Argentina (Bachelor's thesis, Universidad Nacional del Comahue. Facultad de Ingeniería).
- Chamorro, V. C., P. Vásquez, C. D. Perez, L. F. Montenegro, H. H. Hennig, and A. A. Pazos. 2020. Capacidad antioxidante y actividad antihipertensiva en carne de pacú (*Pyaractus mesopotamicus*). *Revista Argentina de Producción Animal* **40** (supl. 1) <http://hdl.handle.net/20.500.12123/8717>
- Chasseaud, L. 1992. The importance of pharmacokinetic/toxicokinetic and metabolic information in carcinogenicity study design. *Drug Information Journal* **26**:445-455.

- Cheli, F., Pinotti, L., Novacco, M., Ottoboni, M., Tretola, M., & Dell'Orto, V. 2017. Mycotoxins in wheat and mitigation measures. Wheat improvement, management and utilization. Croatia: IntechOpen: London, 227-251.
- Cheng, J., S. Huang, C. Fan, N. Zheng, Y. Zhang, S. Li, and J. Wang. 2017. Metabolomic analysis of alterations in lipid oxidation, carbohydrate and amino acid metabolism in dairy goats caused by exposure to Aflatoxin B₁. *Journal of Dairy Research* **84**:401-406.
- Citil, M., V. Gunes, O. Atakisi, A. Ozcan, M. Tuzcu, and A. Dogan. 2005. Protective effect of L-carnitine against oxidative damage caused by experimental chronic aflatoxicosis in quail (*Coturnix coturnix*). *Acta Veterinaria Hungarica* **53**:319-324.
- CODEX. 2006. Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias comité del codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. **38º período de sesiones La Haya, Países Bajos, 24–28 de abril de 2006.**
- CODEX. 2013. Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias: cambios de redacción a la norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos. **Séptima reunión Moscú (Federación Rusa), 8–12 de abril de 2013**
- Coppock, R. W., R. G. Christian, and B. J. Jacobsen. 2018. Chapter 69 - Aflatoxins. Pages 983-994 in R. C. Gupta, editor. *Veterinary Toxicology* (Third Edition). Academic Press.
- Costa, C., M. Maraschin, and M. Rocha. 2016. An R package for the integrated analysis of metabolomics and spectral data. *Computer Methods Programs In Biomedicine* **129**:117-124.
- Costamagna, D., M. Gaggiotti, C. A. Chiericatti, L. Costabel, G. M. L. Audero, M. Taverna, and M. L. Signorini. 2019. Quantification of aflatoxin M1 carry-over rate from feed to soft cheese. *Toxicology Reports* **6**:782-787.
- Dacasto, M., C. Eeckhoutte, F. Capolongoa, J. Dupuy, M. Carletti, C. Calléja, C. Nebbia, M. Alvinerie, and P. Galtier. 2005. Effect of breed and gender on bovine liver cytochrome P450 3A (CYP3A) expression and inter-species comparison with other domestic ruminants. *Veterinary research* **36**:179-190.
- David, A., A. Abdul-Sada, A. Lange, C. R. Tyler, and E. M. Hill. 2014. A new approach for plasma (xeno)metabolomics based on solid-phase extraction and nanoflow liquid chromatography-nanoelectrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1365**:72-85.
- Davis, K. D., N. Aghaeepour, A. H. Ahn, M. S. Angst, D. Borsook, A. Brenton, M. E. Burczynski, C. Crean, R. Edwards, and B. Gaudilliere. 2020. Discovery and validation of biomarkers to aid the development of safe and effective pain therapeutics: challenges and opportunities. *Nature Reviews Neurology* **16**:381-400.
- De Bandt, J.-P., P. Jegatheesan, and N. Tennoune-El-Hafaia. 2018. Muscle loss in chronic liver diseases: the example of nonalcoholic liver disease. *Nutrients* **10**:1195.
- Deng, P., X. Li, M. Petriello, C. Wang, A. Morris, and B. Hennig. 2019. Application of metabolomics to characterize environmental pollutant toxicity and disease risks. *Reviews on environmental health* **34**:251-259.
- Deng, S.-X., L.-X. Tian, F.-J. Liu, S.-J. Jin, G.-Y. Liang, H.-J. Yang, Z.-Y. Du, and Y.-J. Liu. 2010. Toxic effects and residue of aflatoxin B₁ in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure. *Aquaculture* **307**:233-240.
- Deng, Y., Q. Deng, Y. Wang, L. Sun, R. Wang, L. Ye, J. Liao, and R. Gooneratne. 2020. Tolerance and bio-accumulation of aflatoxin B₁ in invertebrate *Litopenaeus vannamei* and vertebrate (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*:735055.
- Depledge, M., and M. Fossi. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* **3**:161-172.
- Dettmer, K. H., Bruce D. 2004. Metabolomics--a new exciting field within the " omics" sciences. *Environmental Health Perspectives* **112**:A396-A397.
- Dhama K, Latheef SK, Dadar M, Samad HA, Munjal A, Khandia R, Karthik K, Tiwari R, Yattoo MI, Bhatt P, Chakraborty S, Singh KP, Iqbal HMN, Chaicumpa W, Joshi SK. 2019 Biomarkers in Stress Related Diseases/Disorders: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Values. *Front Mol Biosci*. 2019 Oct 18;6:91. doi: 10.3389/fmolb.2019.00091. PMID: 31750312; PMCID: PMC6843074.
- Di Giulio, R., W. Benson, B. Sanders, and P. Van Veld. 2020. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. Pages 523-561 *Fundamentals of aquatic toxicology*. CRC Press. eBook ISBN9781003075363
- Dirican, S. 2015. A review of effects of aflatoxins in aquaculture. *Applied Research Journal* **1**:192-196.

- Dohnal, V., Q. Wu, and K. Kuča. 2014. Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of Toxicology* **88**:1635-1644.
- Domingo-Almenara X, Siuzdak G 2020. Metabolomics Data Processing Using XCMS. *Methods in Molecular Biology*.2104:11-24. doi: 10.1007/978-1-0716-0239-3_2. PMID: 31953810.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Opinion of the Scientific Committee related to Uncertainties in Dietary Exposure Assessment. *EFSA Journal*, 5(1), 438.
- EFSA. 2014. Explanatory statement for the applicability of the Guidance of the EFSA Scientific Committee on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed for GMO risk assessment. *EFSA Journal* **12**:3871.
- EFSA. 2018a. Appropriateness to set a group health-based guidance value for fumonisins and their modified forms.*in* H. K. Knutsen, L. Barregård, M. Bignami, B. Brüschweiler, S. Ceccatelli, B. Cottrill, M. Dinovi, L. Edler, and B. Grasl-Kraupp, editors. Panel on Contaminants in the Food Chain. *Efsa Journal*.
- EFSA. 2018b. Guidance on the assessment of the efficacy of feed additives. *EFSA Journal* **16**:e05274.
- El-Sayed, Y. S., and R. H. Khalil. 2009. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B₁ in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Food and Chemical Toxicology* **47**:1606-1609.
- El-Mekawy, H., M. Al-Kahtani, A. Shati, M. Alshehri, A. Al-Doaiss, A. Elmansi, and A. Ahmed. 2020. Black tea and curcumin synergistically mitigate the hepatotoxicity and nephropathic changes induced by chronic exposure to aflatoxin- B₁ in Sprague–Dawley rats. *Journal of Food Biochemistry* **44**:e13346.
- EPA. 2009. Test Guidelines for Pesticides and Toxic Substances. 74 FR 17479
- Eskola, M., G. Kos, C. T. Elliott, J. Hajšlová, S. Mayar, and R. Krska. 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **60**:2773-2789.
- Espinoza, M. 2019. The role of non-technical factors in the development of Latin American aquaculture. *Aquaculture Development in Less Developed Countries*, 53-59.
- EUR-Lex. 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs.*in* C. R. E. N. 401/2006, editor. Official Journal of the European Union L 70, 9 March 2006, pp. 12-34.
- Fagbenro, O., and K. Jauncey. 1995. Water stability, nutrient leaching and nutritional properties of moist fermented fish silage diets. *Aquacultural Engineering* **14**:143-153.
- FAO. 2004. Reglamentos a Nivel Mundial Para las Micotoxinas en Los Alimentos y en Las Raciones en el Año 2003.*in* N. Division, editor. FAO Food and Nutrition Paper, Rome Italy.
- FAO. 2016. Estadísticas sobre Costos de Producción Agrícola Lineamientos para la Recolección, Compilación y Difusión de Datos. Roma.
- FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- FAO. 2020. Fisheries and Aquaculture topics. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Rome. Updated 1 July 2020.
- Forsberg, E. M., T. Huan, D. Rinehart, H. P. Benton, B. Warth, B. Hilmers, and G. Siuzdak. 2018. Data processing, multi-omic pathway mapping, and metabolite activity analysis using XCMS Online. *Nature Protocols* **13**:633-651.
- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology* **22**:241-253.
- Froese, R., A. C. Tsikliras, and K. I. Stergiou. 2011. Editorial note on weight–length relations of fishes. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* **41**:261-263.
- Gallagher, E. P., K. L. Kunze, P. L. Stapleton, and D. L. Eaton. 1996. The kinetics of aflatoxin B₁ Oxidation by human cDNA-Expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicology Applied Pharmacology* **141**:595-606.
- Gambaudo, S. 2014. Diseño, Implementación y Certificación de Sistema de Gestión de Inocuidad Alimentaria en Planta de Alimentos Balanceados para la Nutrición Animal (Doctoral dissertation, Universidad Católica de Córdoba).
- Gao, Y.-N., C.-Q. Wu, J.-Q. Wang, and N. Zheng. 2022. Metabolomic Analysis Reveals the Mechanisms of hepatotoxicity induced by aflatoxin M₁ and ochratoxin A. *Toxins* **14**:141.
- Ghaednia B, Bayat M, Sohrabi Haghdoost I, Motallebi AA, Sepahdari A, Mirbakhsh M, et al. Effects of aflatoxin b1 on growth performance, health indices, phagocytic activity and histopathological alteration in *fenneropenaeus indicus*. *Iranian Sci Fisheries J.* 2013;12(2):723–37

- Gibaldi, M., and D. Perrier. 1982. *Farmacocinética*. ISBN 10: 842915535X / ISBN 13: 9788429155358
Editorial: Reverte
- Gika, H., C. Virgiliou, G. Theodoridis, R. S. Plumb, and I. D. Wilson. 2019. Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/metabolomics): The state of the art. *Journal of Chromatography B* **1117**:136-147.
- Gilbert-Sandoval, I., S. Wesseling, and I. M. Rietjens. 2020. Predicting the acute liver toxicity of aflatoxin B₁ in rats and humans by an in vitro-in silico testing strategy. *Molecular Nutrition Food Research International*:2000063.
- Gilbert, R. J., H. E. Johnson, M. K. Winson, J. J. Rowland, R. Goodacre, A. R. Smith, M. A. Hall, and D. B. Kell. 1999. Genetic programming as an analytical tool for metabolome data. *Late-Breaking Papers of EuroGP-99*. CWI, Amsterdam:23-33.
- Gómez-Arroyo, S., Martínez-Valenzuela, C., Villalobos-Pietrini, R., & Waliszewski, S. 2011. Pesticides: Genotoxic Risk of Occupational Exposure. *PESTICIDES 7 THE IMPACTS OF PESTICIDE EXPOSURE*, 303.
- Gonçalves, R. A., T. Do Cam, N. N. Tri, G. A. Santos, P. Encarnaçã, and L. T. Hung. 2018a. Aflatoxin B₁ (AFB₁) reduces growth performance, physiological response, and disease resistance in Tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*). *Aquaculture International* **26**:921-936.
- Gonçalves, R. A., K. Naehrer, and G. A. Santos. 2018b. Occurrence of mycotoxins in commercial aquafeeds in Asia and Europe: a real risk to aquaculture? *Reviews in Aquaculture* **10**:263-280.
- Gonçalves, R. A., D. Schatzmayr, A. Albalat, and S. Mackenzie. 2020. Mycotoxins in aquaculture: feed and food. *Reviews in Aquaculture* **12**:145-175.
- GONZALEZ, Jaime Fernando. Hepatic Phase I and II Biotransformation Kinetics in Fishes: A Comparative Study. 2006. Tesis Doctoral. University of Maryland, College Park <http://hdl.handle.net/1903/4161>
- Gowda, H., J. Ivanisevic, C. H. Johnson, M. E. Kurczy, H. P. Benton, D. Rinehart, T. Nguyen, J. Ray, J. Kuehl, B. Arevalo, P. D. Westenskow, J. Wang, A. P. Arkin, A. M. Deutschbauer, G. J. Patti, and G. Siuzdak. 2014. Interactive XCMS Online: Simplifying Advanced Metabolomic Data Processing and Subsequent Statistical Analyses. *Analytical Chemistry* **86**:6931-6939.
- Grauso, L., M. Zotti, W. Sun, B. de Falco, V. Lanzotti, and G. Bonanomi. 2019. Spectroscopic and multivariate data-based method to assess the metabolomic fingerprint of Mediterranean plants. *Phytochemical Analysis* **30**:572-581.
- Grech, A., C. Brochot, J. L. Dorne, N. Quignot, F. Y. Bois, and R. Beaudouin. 2017. Toxicokinetic models and related tools in environmental risk assessment of chemicals. *The Science of the total environment*. **578**:1-15.
- Gruber-Dorninger, C., T. Jenkins, and G. Schatzmayr. 2019. Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. *Toxins* **11**:375.
- Guengerich, P. 2006. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS Journal* 2006 **8**:E101-E111.
- Guengerich, P., W. Johnson, T. Shimada, Y. Ueng, H. Yamazaki, and S. Langouët. 1998. Activation and detoxication of aflatoxin B₁. *Mutation Research/Fundamental Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **402**:121-128.
- Guengerich, P., W. Johnson, Y. Ueng, H. Yamazaki, and T. Shimada. 1996. Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B₁ and relevance to risk of human liver cancer. *Environmental Health Perspectives* **104**:557-562.
- Gutiérrez, M. 1967. Coloración histológica para ovarios de peces, crustáceos y moluscos. (IIP) *Investigación Pesquera* **31**:265-272.
- Hassaan, M. S., K. M. Nssar, E. Y. Mohammady, A. Amin, S. I. Tayel, and E. R. El-Haroun. 2020. Nano-zeolite efficiency to mitigate the aflatoxin B₁ (AFB₁) toxicity: Effects on growth, digestive enzymes, antioxidant, DNA damage and bioaccumulation of AFB₁ residues in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **523**.
- Hendricks, J. D., D. N. Arbogast, C. B. Pereira, and G. S. Bailey. 1994. Long-term, high-dose dietary exposure of rainbow trout to butylated hydroxyanisole in non-carcinogenic. *Cancer Letters* **78**:189-193.
- Hood, R. B., D. Liang, Y. H. Chiu, H. Sandoval-Insauti, J. E. Chavarro, D. Jones, R. Hauser, and A. J. Gaskins. 2022. Pesticide residue intake from fruits and vegetables and alterations in the serum metabolome of women undergoing infertility treatment. *Environment International* **160**.

- Hoofst, J. M., A. E. H. I. Elmor, P. Encarnaç o, and D. P. Bureau. 2011. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON). *Aquaculture* **311**:224-232.
- Hou R, Yuan S, Feng C, Xu Y, Rao K, Wang Z. Toxicokinetic patterns, metabolites formation and distribution in various tissues of the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to tri(2-butoxyethyl) phosphate (TBOEP) and tri-n-butyl phosphate (TNBP). *Sci Total Environ.* 2019 Jun 10;668:806-814. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.038. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30870749.
- Houlihan, D., T. Boujard, and M. Jobling. 2008. Food intake in fish. John Wiley & Sons.
- Hoyos, J. L., Villada, H. S., Fern andez, A., & Ortega-Toro, R. 2017. Par metros de calidad y metodolog as para determinar las propiedades f sicas de alimentos extruidos para peces. *Informaci n tecnol gica*, 28(5), 101-114.
- Hua, K., J. M. Cobcroft, A. Cole, K. Condon, D. R. Jerry, A. Mangott, C. Praeger, M. J. Vucko, C. Zeng, and K. J. O. E. Zenger. 2019. The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth.* **1**:316-329.
- Huang, Y., D. Han, X. Zhu, Y. Yang, J. Jin, Y. Chen, and S. Xie. 2011. Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B₁. *Aquaculture* **319**:89-97.
- Hussain, D. M., Abdul; Gatlin III, Delbert. 2017. Alleviation of aflatoxin B₁ (AFB₁) toxicity by calcium bentonite clay: Effects on growth performance, condition indices and bioaccumulation of AFB₁ residues in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **475**:8-15.
- IARC. 2012. A Review of Human Carcinogens. F. Chemical Agents and Related Occupations: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.
- Ing enbleek, L., L. Lautz, G. Dervilly, K. Darney, M. Astuto, J. Tarazona, A. Liem, G. Kass, J. Leblanc, and P. Verger. 2020. Risk Assessment of Chemicals in Food and Feed: Principles, Applications and Future Perspectives. In *Environmental Pollutant Exposures and Public Health* (pp. 1-38): The Royal Society of Chemistry
- Irwin, S., M. S. Flaherty, and J. Carolsfeld. 2020. The contribution of small-scale, privately owned tropical aquaculture to food security and dietary diversity in Bolivia. *Food Security.* **13** 199–218
- Jalilpour, J., A. Sepahdari, S. Kakoolaki, H. Vahabzadeh, and Z. Pajand. 2018. Effects of aflatoxin B₁ contaminated feeds on growth performance, blood parameters and liver enzymes of farmed *Acipenser stellatus* fingerlings. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health* **4**:95-108.
- Jantrarat, W., R. T. Lovell, and J. M. Grizzle. 1990. Acute toxicity of aflatoxin B₁ to Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* **2**:237-247.
- JECFA. 2011. Safety evaluation of certain contaminants in food: prepared by the Seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). in J. FAO/WHO, editor. *World Health Organization*.
- JECFA. 2017. Evaluation of certain contaminants in food: eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *World Health Organization*.
- Jellyman, P., D. Booker, S. Crow, M. Bonnett, and D. Jellyman. 2013. Does one size fit all? An evaluation of length–weight relationships for New Zealand's freshwater fish species. *New Zealand Journal of Marine Freshwater Research* **47**:450-468.
- Kamala, A., C. Shirima, B. Jani, M. Bakari, H. Sillo, N. Rusibamayila, S. De Saeger, M. Kimanya, Y. Y. Gong, and A. Simba. 2018. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Tanzania during 2016. *World Mycotoxin Journal* **11**:311-320.
- Kara, A., C. Sađlam, D. Acarli, and  . Cengiz. 2017. Length-weight relationships for 48 fish species of the Gediz estuary, in Izmir Bay (Central Aegean Sea, Turkey). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **98**:879-884.
- Karuna, R. C., Isabelle; Sailer, Andreas; Bitsch, Francis; Zhang, Juan. 2015. Detection of dihydroxycholesterols in human plasma using HPLC–ESI-MS/MS. *Steroids* **99**:131-138.
- Kelly, J., D. Eaton, P. Guengerich, and R. Coulombe Jr. 1997. Aflatoxin B₁ activation in human lung. *Toxicology Applied Pharmacology* **144**:88-95.
- Kleiner, D. E., & Brunt, E. M. 2012. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. In *Seminars in liver disease* (Vol. 32, No. 01, pp. 003-013). Thieme Medical Publishers.
- Kuiper-Goodman, T. 1995. Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicology Letters* **82**:853-859.
- Kuo, D. T. F., and C. C. Chen. 2016. Deriving in vivo biotransformation rate constants and metabolite parent concentration factor/stable metabolite factor from bioaccumulation and bioconcentration

- experiments: An illustration with worm accumulation data. *Environmental Toxicology Chemistry* **35**:2903-2909.
- Lateef, N. A. 2021. Toxicity of anthracene on the function of the liver and kidney of the common carp *Cyprinus carpio*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology Fisheries* **25**:831-840.
- Li, L., S. M. Limbu, Q. Ma, L. Q. Chen, M. L. Zhang, and Z. Y. Du. 2019. The metabolic regulation of dietary L-carnitine in aquaculture nutrition: present status and future research strategies. *Reviews in Aquaculture* **11**:1228-1257.
- Li, Y. C., Wang, R., Sun, R. B., Na, S. J., Liu, T., Ding, X. S., & Ge, W. H. (2022). Cerebrospinal fluid metabolic profiling reveals divergent modulation of pentose phosphate pathway by midazolam, propofol and dexmedetomidine in patients with subarachnoid hemorrhage: a cohort study. *BMC anesthesiology*, *22*(1), 1-12.
- Lima, M. D. M., P. I. C. Mujica, and A. M. Lima. 2012. Caracterização química e avaliação do rendimento em filés de caranha (*Piaractus mesopotamicus*). *Brazilian Journal of Food Technology* **15**:41-46.
- López Aca, V., P. V. Gonzalez, and P. Carriquiriborde. 2018. Lethal and sublethal responses in the fish, *Odontesthes bonariensis*, exposed to chlorpyrifos alone or under mixtures with endosulfán and lambda-cyhalothrin. *Ecotoxicology* **27**:968-979.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**:265-275.
- MAGyP. 2010. La acuicultura en el agro: un proyecto de desarrollo de acuicultura en aguas calidas y templadas. *in* d. D. Acuicultura. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca
- MAGyP. 2019. Producción de acuicultura destinada al consumo humano durante el año 2019. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca
- MAGyP. 2020. Análisis del sector acuícola argentino, Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca.
- Marijani E, Kigadye E, Okoth S. Occurrence of fungi and mycotoxins in fish feeds and their impact on fish health. *Int J Microbiol*. 2019 Nov 11;2019:6743065. doi: 10.1155/2019/6743065. PMID: 31827520; PMCID: PMC6881585.
- Martyniuk, C. J. G., Robert J; Denslow, Nancy D. 2011. Omics in aquatic toxicology: not just another microarray. *Environmental Toxicology Chemistry and Ecology* **30**:263-264.
- Medina, A., A. Rodriguez, and N. Magan. 2014. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁ production. *Frontiers in Microbiology* **5**:348.
- Mevik, B.-H., R. Wehrens, K. H. Liland, and P. Hiemstra. 2019. Multivariate regression methods Partial Least Squares Regression (PLSR), Principal Component Regression (PCR) and Canonical Powered Partial Least Squares (CPPLS). <https://mevik.net/work/software/pls.html>
- Michelin, E., C. Bedoya-Serna, L. Carrion, S. Godoy, J. Baldin, C. Lima, G. Yasui, G. Rottinghaus, R. Sousa, and A. Fernandes. 2021a. Long-term exposure of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fish to dietary aflatoxin B₁: residues in tissues and performance. *World Mycotoxin Journal*: 14(3), 411-419.
- Michelin, E., C. Bedoya-Serna, L. Carrion, N. Levy-Pereira, F. Cury, D. Passarelli, C. Lima, G. Yasui, R. Sousa, and A. Fernandes. 2021b. Effects of dietary aflatoxin on biochemical parameters and histopathology of liver in Matrinxã (*Brycon cephalus*) and Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fish. *World Mycotoxin Journal*: 14(3), 421-430.
- Michelin, E. C., M. M. Massocco, S. H. S. Godoy, J. C. Baldin, G. S. Yasui, C. G. Lima, G. E. Rottinghaus, R. L. M. Sousa, and A. M. Fernandes. 2017. Carryover of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*) tissues. *Food Additives & Contaminants: Part A* **34**:265-272.
- Milián-Sorribes, M. C., S. Martínez-Llorens, C. Cruz-Castellón, M. Jover-Cerdá, and A. Tomás-Vidal. 2021. Effect of fish oil replacement and probiotic addition on growth, body composition and histological parameters of yellowtail (*Seriola dumerili*). *Aquaculture Nutrition* **27**:3-16.
- Miller, M. G. 2007. Environmental metabolomics: a SWOT analysis (strengths, weaknesses, opportunities, and threats). *Journal of Proteome Research* **6**:540-545.
- Miraglia, M., B. De Santis, and C. Brera. 2008. Climate change: Implications for mycotoxin contamination of foods. *Journal of Biotechnology*: (136), S715.
- Miraglia, M., H. Marvin, G. Kleter, P. Battilani, C. Brera, E. Coni, F. Cubadda, L. Croci, B. De Santis, and S. Dekkers. 2009. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food Chemical Toxicology* **47**:1009-1021.
- Mirza Alizadeh, A., A. Mousavi Khaneghah, and H. Hosseini. 2021. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in aquaculture and seafood: a review and new perspective. *Toxin Reviews*:1-8.

- Mohamed, H. M., Emeish, W. F., Braeuning, A., & Hammad, S. 2017. Detection of aflatoxin-producing fungi isolated from Nile tilapia and fish feed. *EXCLI journal*, 16, 1308-1318
- Montoya-Camacho, N., Marquez-Ríos, E., Castillo-Yáñez, F. J., Cárdenas López, J. L., López-Elías, J. A., Ruíz-Cruz, S. & Ocaño-Higuera, V. M. 2019. Advances in the use of alternative protein sources for tilapia feeding. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 515-526.
- Moosavi, M., M. Rezaei, H. Kalantari, A. Behfar, and G. Varnaseri. 2016. L-carnitine protects rat hepatocytes from oxidative stress induced by T-2 toxin. *Drug Chemical Toxicology* 39:445-450.
- Mulokozi, D. P., Mmanda, F. P., Onyango, P., Lundh, T., Tamatamah, R., & Berg, H. (2020). Rural aquaculture: Assessment of its contribution to household income and farmers' perception in selected districts, Tanzania. *Aquaculture Economics & Management*, 24(4), 387-405.
- Nachit, M., W. J. Kwanten, J.-P. Thissen, B. O. De Beeck, L. Van Gaal, L. Vonghia, A. Verrijken, A. Driessen, Y. Horsmans, and S. Francque. 2021. Muscle fat content is strongly associated with NASH: a longitudinal study in patients with morbid obesity. *Journal of Hepatology*. 75:292-301
- Nagana Gowda, G., and D. Raftery. 2013. Biomarker discovery and translation in metabolomics. *Current Metabolomics* 1:227-240.
- Narváez, A., Izzo, L., Pallarés, N., Castaldo, L., Rodríguez-Carrasco, Y., & Ritieni, A. (2021). Human Biomonitoring of T-2 Toxin, T-2 Toxin-3-Glucoside and Their Metabolites in Urine through High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxins*, 13(12), 869
- Naylor, R. L., R. W. Hardy, D. P. Bureau, A. Chiu, M. Elliott, A. P. Farrell, I. Forster, D. M. Gatlin, R. J. Goldberg, and K. Hua. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:15103-15110.
- Neal, G., D. Eaton, D. Judah, and A. Verma. 1998. Metabolism and toxicity of aflatoxins M₁ and B₁ in human-derived in Vitro Systems. *Toxicology Applied Pharmacology* 151:152-158.
- Nebert, D. W. 1997. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *American Journal Of Human Genetics* 60: 265–271.
- Newman, M. 2019. *Fundamentals of ecotoxicology: the science of pollution*. CRC Press. Fifth Edition.
- Newman, M. 2015. *Fundamentals of ecotoxicology : the science of pollution*. CRC press., Fourth Edition.
- Nicholson, J. K., E. Holmes, and J. C. Lindon. 2006. *The handbook of metabonomics and metabolomics*. 1st Edition edition. Elsevier
- Nielsen, S. S. 2017. Introduction to food analysis. *in* C. Springer, editor. *Food analysis*. Springer.
- Niki, E., Y. Yoshida, Y. Saito, and N. Noguchi. 2005. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical Biophysical Research Communications* 338:668-676.
- Nomura, H., M. Ogiso, M. Yamashita, H. Takaku, A. Kimura, M. Chikasou, Y. Nakamura, S. Fujii, M. Watai, and H. Yamada. 2011. Uptake by dietary exposure and elimination of aflatoxins in muscle and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Agriculture Food Chemistry* 59:5150-5158.
- Nunes, E. M. C. G., M. M. G. Pereira, A. P. R. Costa, M. N. B. A. Araripe, R. M. Calvet, C. M. Pereyra, M. L. X. Azevedo, R. E. E. Pinheiro, V. C. Alves, A. M. Conde Júnior, L. S. N. Ramos, J. B. Lopes, C. G. Marinho, and M. C. S. Muratori. 2019. Effects of aflatoxin B₁ on performance and health of tambaqui fingerlings (*Colossoma macropomum*). *International Aquatic Research* 11:73-83.
- Oehme, M., T. S. Aas, H. J. Olsen, M. Sørensen, M. Hillestad, Y. Li, and T. Åsgård. 2014. Effects of dietary moisture content of extruded diets on physical feed quality and nutritional response in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition* 20:451-465.
- Ogle, D. H., and I. J. Winfield. 2009. Ruffe length–weight relationships with a proposed standard weight equation. *North American Journal of Fisheries Management* 29:850-858.
- Ogunade, I., Y. Jiang, and A. Pech Cervantes. 2019. DI/LC–MS/MS-based metabolome analysis of plasma reveals the effects of sequestering agents on the metabolic status of dairy cows challenged with aflatoxin B₁. *Toxins* 11:693.
- Oliveira, M., and V. Vasconcelos. 2020. Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: a review. *Toxins* 12:160.
- Ostry, V., F. Malir, J. Toman, and Y. Grosse. 2017. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research* 33:65-73.
- Owen, R. G., Tamara S.; Hagger, Josephine A.; Jones, Malcolm B.; Depledge, Michael H. 2008. Biomarkers and environmental risk assessment: Guiding principles from the human health field. *Marine Pollution Bulletin* 56:613-619.
- Pang, Z., J. Chong, S. Li, and J. Xia. 2020. MetaboAnalystR 3.0: toward an optimized workflow for global metabolomics. *Metabolites* 10:186.

- Panpatte, D. G., and Y. K. Jhala. 2021. Microbial Rejuvenation of Polluted Environment. Springer, Singapore.
- Panqueva, R. d. P. L. 2014. Enfermedad hepática grasa. Aspectos patológicos. Revista Colombiana De Gastroenterología **29**:82-88.
- Patil, R. V., O. A. Apine, and K. D. Pawar. 2020. Comparative flower metabolomics analysis in polygamodioecious *Garcinia indica* choisy indicates flower gender type specific metabolite accumulation. Biocatalysis Agricultural Biotechnology **30**:101836.
- Peña, D. G. 2007. La exposición a la aflatoxina B₁ en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. Salud Pública de México. **49**:227-235.
- Perry, D. 1959. Bligh-Dyer method of lipids extraction. Canadian Journal Of Biochemistry. **37**:911-917.
- Pfluger, B. A., H. V. Smith, A. M. Weber, H. Ibrahim, L. Doumbia, A. Bore, A. Cissoko, S. Douyon, K. Kone, L. Sangare, A. Maiga, O. A. Koita, K. Goodman, A. M. Evans, and E. P. Ryan. 2022. Non-Targeted dried blood spot-based metabolomics analysis showed rice bran supplementation effects multiple metabolic pathways during infant weaning and growth in Mali. Nutrients **14**. :609.
- Pietsch, C. 2020. Risk assessment for mycotoxin contamination in fish feeds in Europe. Mycotoxin Research **36**:41-62.
- Pitt, J. I., and A. D. Hocking. 2009. *Aspergillus* and Related Teleomorphs. Pages 275-337 Fungi and Food Spoilage. Springer US, Boston, MA.
- Prasain, J. (Ed.). 2016. Metabolomics - Fundamentals and Applications. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/62614>.
- Quabius, E., D. Nolan, H. Segner, and S. Bonga. 2001. Confinement stress and starvation modulate the induction of EROD activity after dietary exposure to PCB 126 in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Fish Physiology and Biochemistry. **25**:109-119.
- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. URL <http://www.R-project.org>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rana, K. J., S. Siriwardena, and M. R. Hasan. 2009. Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Rotimi, O. A., S. O. Rotimi, C. U. Duru, O. J. Ebebeinwe, A. O. Abiodun, B. O. Oyeniyi, and F. A. Faduyile. 2017. Acute aflatoxin B₁-Induced hepatotoxicity alters gene expression and disrupts lipid and lipoprotein metabolism in rats. Toxicology Reports **4**:408-414.
- Rushing, B. R., and M. I. Selim. 2019. Aflatoxin B₁: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. Food Chemical Toxicology **124**:81-100.
- Sal, F., G. Wicki, and O. Merino. 2009. Evaluación del crecimiento del Amur (*Ctenopharyngodon idella*) en dos fases, pre-engorde y engorde, con diferentes dietas y densidades de cultivo. Natura Neotropicalis **40**:29-42.
- Sal, F., G. Wicki, O. G. Merino, P. Candarle, and L. Luchini. 2015. inclusión de ensilado ácido en dietas extruidas para el engorde de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) En jaulas en el nordeste argentino. Natura Neotropicalis **46**:15.
- Sanchis, V. and Magan, N. (2004) Environmental conditions affecting mycotoxins. In Mycotoxins in Food Detection and Control ed. Magan, N. and Olsen, M. pp. 174–189. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.
- Santacroce, M. P., M. C. Conversano, E. Casalino, O. Lai, C. Zizzadoro, G. Centoducati, and G. Crescenzo. 2007. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. Reviews in Fish Biology and Fisheries **18**:99-130.
- Santacroce, M. P., M. Narracci, M. I. Acquaviva, V. Zacchino, R. Lo Noce, G. Centoducati, and R. A. Cavallo. 2011. Effects induced in vitro by aflatoxin B₁ on *Vibrio fischeri* and primary cultures of *Sparus aurata* hepatocytes. Chemistry and Ecology **27**:67-76.
- Santos, E. A. d., C. d. Cruz, S. P. Carraschi, J. R. Marques Silva, R. Grossi Botelho, E. D. Velini, and R. A. Pitelli. 2015. Atrazine levels in the Jaboticabal water stream (São Paulo State, Brazil) and its toxicological effects on the pacu fish *Piaractus mesopotamicus* Archives of Industrial Hygiene and Toxicology **66**:73-82.
- Santos, G.A.; Rodrigues, I.; Naehrer, K.; Encarnacao, P. Mycotoxins in aquaculture: Occurrence in feed components and impact on animal performance. Aquac. Eur. 2010, 35, 6–10.
- Silins, I., and J. Högberg. 2011. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. International Journal Of Environmental Research Public Health **8**:629-647.

- Smith, C. A. 2017. LC/MS Preprocessing and Analysis with xcms. Documentation of Bioconductor xcms package.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*, 78(3), 779-787.
- SØRensen, M. 2012. A review of the effects of ingredient composition and processing conditions on the physical qualities of extruded high-energy fish feed as measured by prevailing methods. *Aquaculture Nutrition* 18:233-248.
- Stephensen, E. k., J. Sturve, and L. Förlin. 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Biochemistry and Physiology* 133:435-442.
- Swanson, D., R. Block, and S. A. Mousa. 2012. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in nutrition* 3:1-7.
- Takahashi, L. S., J. D. Biller, E. Criscuolo-Urbinati, and E. C. Urbinati. 2011. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: effects on farmed pacu production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95:259-266.
- Tang, B., X.-J. Luo, Y.-H. Zeng, and B.-X. Mai. 2017. Tracing the Biotransformation of PCBs and PBDEs in common carp (*Cyprinus carpio*) using compound-specific and enantiomer-specific stable carbon isotope analysis. *Environmental Science & Technology* 51:2705-2713.
- Tapia-Salazar, M.; García-Pérez, O.D.; Nieto-López, M.; Ricque-Marie, D.; Villarreal-Cavazos, D.; Cruz-Suárez, L.E. Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura, In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 10., Nuevo León, México, 2010. San Nicolás de los Garza: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2010. 726p. p. 514-546.
- Tautenhahn, R., Patti, G. J., Rinehart, D., & Siuzdak, G. 2012. XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Analytical chemistry*, 84(11), 5035-5039.
- Thiendedsakul, P., P. Boonsoongnern, P. Jara, and P. Tulayakul. 2020. Comparative liver metabolic enzyme activity of cytochrome P450 and glutathione-S-transferase in crocodile (*Crocodylus siamensis*) and livestock. *Toxicology Pharmacology Research & Perspectives Comparative Biochemistry Physiology Part C*. 235:108784
- Thiex, N. J., H. Manson, S. Anderson, and J.-Å. Persson. 2002. Determination of crude protein in animal feed, forage, grain, and oilseeds by using block digestion with a copper catalyst and steam distillation into boric acid: collaborative study. *AOAC International* 85:309-317.
- Timbrell, J.A. 2008. Principles of Biochemical Toxicology (4th ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.3109/9781420007084>
- Tocher, D. R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11:107-184.
- Tomalik-Scharte, D., A. Lazar, U. Fuhr, and J. Kirchheiner. 2008. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *The Pharmacogenomics Journal* 8:4-15.
- USDA. 2021. Grain: World Markets and Trade. *in* F. A. Service, editor.
- Valenti, W. C., Kimpara, J. M., & de L Preto, B. 2011. Measuring aquaculture sustainability. *World Aquaculture*, 42(3), 26.
- Valladão, G., S. Gallani, and F. Pilarski. 2018. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 10:351-369.
- Wang, X. 2016. Response of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) to different dietary concentrations of aflatoxin B₁ and evaluation of an aflatoxin binder in offsetting its negative effects. *Ciencias Marinas* 42:15-29.
- Watson, W. P., and A. Mutti. 2004. Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects. *Biomarkers* 9:211-242.
- Wegner, K., S. Just, L. Gau, H. Mueller, P. Gérard, P. Lepage, T. Clavel, and S. Rohn. 2017. Rapid analysis of bile acids in different biological matrices using LC-ESI-MS/MS for the investigation of bile acid transformation by mammalian gut bacteria. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 409:1231-1245.
- Wicki, G., F. Rossi, S. Panné, and L. Luchini. 2008. Cultivo intensivo del randiá (*Rhamdia quelen*) en jaulas suspendidas en estanques, con empleo de diferentes raciones balanceadas y distinta elaboración. *Desarrollo de Tecnologías para Producción del Randiá*:9-43.
- Wicki, G., E. Wiltchinsky, and L. Luchini. 2003. Cultivo y producción de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Incidencia de dos dietas de diferente composición y de la densidad de siembra, en sistema de

- cultivo semi-intensivo. Dirección de Acuicultura. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA).
- Williams, D. E., Orner, G., Willard, K. D., Tilton, S., Hendricks, J. D., Pereira, C & Bailey, G. S. (2009). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and ultra-low dose cancer studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 175-181.
- Williams, J. H., T. D. Phillips, P. E. Jolly, J. K. Stiles, C. M. Jolly, and D. Aggarwal. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition* **80**:1106-1122.
- Wolf, J. C., and M. J. Wolfe. 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology* **33**:75-85.
- Xu, F., Y. Li, Z. Cao, J. Zhang, and W. Huang. 2021. AFB₁-induced mice liver injury involves mitochondrial dysfunction mediated by mitochondrial biogenesis inhibition. *Ecotoxicology Environmental Safety* **216**:112213.
- Xu, M., J. Wang, L. Yang, and J. Wu. 2020. Identification of metabolite biomarkers in serum of rats exposed to chlorpyrifos and cadmium *Scientific Reports* **10**.
- Yamada, S., K. M. Mak, and C. S. Lieber. 1985. Chronic ethanol consumption alters rat liver plasma membranes and potentiates release of alkaline phosphatase. *Gastroenterology* **88**:1799-1806.
- Yang, Y.-H., C. L. Miranda, M. C. Henderson, J.-L. Wang-Buhler, and D. R. Buhler. 2000. Heterologous expression of Cyp2k1 and identification of the expressed protein (bv-Cyp2k1) as lauric acid (ω -1)-hydroxylase and aflatoxin B₁ exo epoxidase. *Drug Metabolism And Disposition*. **28**:1279-1283.
- Yatim, A. M., and D. S. Sachan. 2001. Carnitine alters binding of aflatoxin to DNA and proteins in rat hepatocytes and cell-free systems. *J Nutrition* **131**:1903-1908.
- Zahrán, E., E. Risha, M. Hamed, T. Ibrahim, and D. Palić. 2020. Dietary mycotoxicosis prevention with modified zeolite (Clinoptilolite) feed additive in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **515**:734562.
- Zamboni, N., A. Saghatelian, and G. J. Patti. 2015. Defining the metabolome: size, flux, and regulation. *Molecular Cell* **58**:699-706.
- Zanger, U. M., and M. Schwab. 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology Therapeutics* **138**:103-141.
- Zeng, Z.-Z., W.-D. Jiang, P. Wu, Y. Liu, Y.-Y. Zeng, J. Jiang, S.-Y. Kuang, L. Tang, X.-Q. Zhou, and L. Feng. 2019. Dietary aflatoxin B₁ decreases growth performance and damages the structural integrity of immune organs in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture* **500**:1-17.
- Zhang, A., H. Sun, G. Yan, P. Wang, and X. J. B. r. i. Wang. 2015. *Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic*. **2015**.
- Zhang, L., Ye, Y., An, Y., Tian, Y., Wang, Y., & Tang, H. 2011. Systems responses of rats to aflatoxin B₁ exposure revealed with metabolomic changes in multiple biological matrices. *Journal of Proteome Research*, 10(2), 614-623.
- Zhao, Y., Y.-F. Mao, Y.-S. Tang, M.-Z. Ni, Q.-H. Liu, Y. Wang, Q. Feng, J.-H. Peng, and Y.-Y. Hu. 2018. Altered oral microbiota in chronic hepatitis B patients with different tongue coatings. *World Journal of Gastroenterology* **24**: 3448–3461.
- Ziglari, T., & Allameh, A. 2013. The significance of glutathione conjugation in aflatoxin metabolism. *Aflatoxins—Recent Advances and Future Prospects*; Razzaghi-Abyaneh, M., Ed, 267-286.
- Zuberi, Z., M. N. Eeza, J. Matysik, J. P. Berry, and A. Alia. 2019. NMR-based metabolic profiles of intact zebrafish embryos exposed to aflatoxin B₁ recapitulates hepatotoxicity and supports possible neurotoxicity. *Toxins* **11**:258.
- A.F. Zuur, E.N. Ieno, N.J. Walker, A.A. Saveliev and G.M. Smith, *Mixed Effect Models and Extensions in Ecology with R*, Springer, Berlin, Heidelberg 2009 ISBN 978-0-387-87457-9 524pp
- Zychowski, K. E., A. R. Hoffmann, H. J. Ly, C. Pohlenz, A. Buentello, A. Romoser, D. M. Gatlin, and T. D. Phillips. 2013. The effect of aflatoxin- B₁ on red drum (*Sciaenops ocellatus*) and assessment of dietary supplementation of NovaSil for the prevention of aflatoxicosis. *Toxins* **5**:1555-1573.

ANEXO: PROTOCOLOS

Histología

Reactivo de Bouin:

Es una solución formada por varias sustancias fijadoras, de uso corriente para la fijación de tejidos blandos, embriones y cartílagos. Su capacidad fijadora se basa en la acción del ácido pícrico, que provoca precipitación de las moléculas, y del formaldehído que forma entrecruzamientos entre proteínas del tejido. La coloración de los tejidos fijados con este líquido se conserva muy bien y puede utilizarse con cualquier colorante, además de ser ligeramente descalcificante.

Preparación del reactivo:

- 15 partes de solución saturada de ácido pícrico
- 5 partes de formol
- 1 parte de ácido acético glacial

El tiempo de fijación es de 1-24 horas, según el tamaño de la pieza, las cuales no deben ser mayores a 5-6 milímetros de espesor.

Preparados en con la tinción hematoxilina-eosina

- Las muestras de Hígado fueron incubadas en heladera toda la noche en

Reactivo de Bouin

- Las muestras fueron lavadas a las 24 h 2 veces con una solución de etanol 70% v/v y se guardó en la misma solución en heladera
- En la sala de microscopia se realizaron dos lavados extras con la misma solución

- Se sumergieron las muestras en las siguientes sustancias
- Alcohol 96° 30 minutos
- Alcohol 96° 30 minutos
- Alcohol 100° 30 minutos
- Alcohol 100° 30 minutos
- Xilol 15 minutos
- Xilol 15 minutos
- Parafina 40 minutos
- Parafina 30 minutos
- Inclusión en parafina
- Corte con micrótopo
- Coloración HE

XCMS

Instrucciones para correr un análisis de datos en el XCMS

Instalación del R

1. Ir a la página oficial del R (<http://cran.stat.ucla.edu/index.html>) y descargar la última versión para Windows (hay varios sitios alternativos de descarga).
2. Una vez descargado el ejecutable, hacer doble click sobre el mismo y seguir las instrucciones.

Instalación del XCMS

Una vez instalado el R:

Ir al comando “packages” y seleccionar “select repositories” y allí seleccionar los de “CRAN” y todo los de “Biodconductor” (manteniendo la tecla “shift” apretada).

Luego ir a “Install packages” y bajar e instalar desde allí los paquetes “multtest”, “xcms” y el ejemplo “faahOK”

Analizar los archivos CDF con el XCMS

- 1- Abrir el programa “R”: ejecutar Rgui.exe (desde acceso directo)
- 2- Cargar el módulo XCMS: tipear en la consola “> library(xcms)”
- 3- INDICAR LA UBICACIÓN DE LOS ARCHIVOS CDF: Ir a “Archivo” en la barra de menú, seleccionar “Cambiar dir...” y en el cuadro de dialogo que se abre, buscar el directorio en el cual se encuentran los subdirectorios con los archivos “cdf” (cada tratamiento debe guardarse en un directorio separado y si cada tratamiento tiene subtratamientos, estos deben estar almacenados como subdirectorios de los primeros).
- 4- FILTRAR E IDENTIFICAR LOS PICOS: ejecutar el comando “> xset <- xcmsSet()”. Como resultado, se listaran tantas filas como archivos “cdf” (corridas cromatograficas) se tenga, ordenadas por directorio. Cada fila tendrá el nombre de la muestra seguido de una serie de pares de números, el primero indica el m/z y el segundo el número de picos hallados para ese punto. Existen diferentes parámetros que se pueden ajustar en este punto, como por ejemplo el modelo de ajuste (por default: gaussiano), el ancho de pico que puede hacerse por la desviación estándar (sigma) o por el ancho de pico a la mitad de la altura (*fwhm*). Por default se da un *fwhm* de 30s y el ancho de la rebanada m/z (por default: 0.1 m/z)
Ej. “> xset <- xcmsSet(*fwhm*=30)”
- 5- HACER CORRESPONDER LOS PICOS ENTRE LAS DISTINTAS MUESTRAS utilizando el comando “> xset <- group(xset)”. Argumentos: Si se quiere visualizar la actividad del algoritmo: ejecutar el comando “> xset <- group(xset, sleep=.001)”. Ello hará que durante la iteración se muestreen cada 0.001s un gráfico mostrando el alineamiento de los picos de las diferentes muestras.
- 6- CORREGIR TIEMPOS DE RETENCIÓN: ejecutar el comando "> xset2 <- retcor(xset, family = "symmetric", plotype = "mdevden)". Argumentos: i) “family” indica la función polinomial usada para aproximar los cambios en la desviación estándar de las muestras. Por default, esta función se ajusta por cuadrados mínimos de todos los datos. Si el argumento se selecciona como “symetric”, entonces el modelo identificará y eliminarán los outliers durante el ajuste. ii) plotype indica que se obtendrá un gráfico útil para supervisar el funcionamiento del algoritmo mostrando los puntos utilizados y el perfil de los desvíos.
- 7- REAGRUPAR LOS PICOS LUEGO DE CORREGIDO EL TIEMPO DE RETENCIÓN: ejecutar el comando “> xset2 <- group(xset2, bw =10)”. Se obtendrán una línea con los m/z de los

grupos. Argumento: bw indica el tiempo de retención permitido para reagrupar los picos. El mismo está predeterminado en 30 seg pero se puede variar dependiendo de las muestras.

- 8- RELLENAR DATOS DE PICOS FALTANTES: ejecutar el comando "> xset3 <- fillPeaks(xset2)". Se obtendrá una línea con el listado de los nombres de cada una de las muestras.
- 9- VISUALIZAR LA INFORMACIÓN DEL NUEVO SET DE DATOS: ejecutar "> xset3". Se obtendrá un resumen del agrupamiento ej. número de picos y número de grupos.
- 10- ANALIZAR Y VISUALIZAR LOS RESULTADOS: ejecutar el comando "> reporttab <- diffreport(xset3, "WT", "KO", "example", 10, metlin = 0.15)". WT y KO son los nombres que les dará a los tratamientos, "example" el nombre del archivo que generara con la información de los picos identificados, 10 es el número de iones cromatograficos extraídos que se graficaran, 0.15 es la tolerancia de valor de m/z que se permitirá para la correspondencia con los metabolitos almacenados en la base de datos METLIN en la identificación de iones cromatográficos. El directorio con los gráficos (lleva el nombre del archivo elegido y la extensión .eic) y el archivo generado es formato .tsv. que puede importarse o abrirse con Excel.

Código XCMS R

```
xset <- xcmsSet(method= "centWave", ppm= 100, peakwidth= c(10,50), noise= 2000, snthresh=
10, mzdiff=-0.2)
xset1 <- retcor(xset, method= "obiwarp", plottype= c("deviation"))
xset2 <- group(xset1, bw= 30)
xset3 <- fillPeaks(xset2)
xset3
reporttab <- diffreport (xset3, filebase="uplc-Plasma")
```

XCMSOnline

```
XCMSOnline version 2.7.2
XCMS    version 1.47.3
CAMERA  version 1.34.0
```

General parameters

```
    Polarity  positive or negative
    Retention time format      minutes
```

2. Feature detection

```
    method : matchedFilter
    fwhm    30
    snthresh 10
    max     10
    step    0.1
```

```

steps      2
mzdiff     0.5
Retention time correction
method : obiwarp
profStep   0.1
4. Grouping
method : density
bw         5
mzwid      0.25
minfrac    0.5
minsamp    1
5. FillPeaks
6. Diffreport
   statistical test      Kruskal Wallis
   statistics.threshold.pvalue    0.01
   statistics.diffReport.value     into
Finished Running Statistical tests
7. Additional Plots & Statistics
   Running mummichog
   Printing MDS plot
   Printing static PCA and Select Scaling plot
8. Annotation (isotopes & adducts)
   featureAnnotation.CAMERA.annotate    isotopes + adducts
   featureAnnotation.CAMERA.mzabs       0.1
   featureAnnotation.CAMERA.ppm         100
   featureAnnotation.CAMERA.sigma        6
   featureAnnotation.CAMERA.perfwhm     0.6
   featureAnnotation.CAMERA.maxcharge    3
   featureAnnotation.CAMERA.maxiso       4
   featureAnnotation.CAMERA.intensity    into
9. Putative ID's (METLIN)
   identification.METLIN.ppm            100
   identification.METLIN.adducts        M+H, M+NH4, M+Na, M+H-H2O, M+H-
2H2O, M+K, M+ACN+H, M+ACN+Na, M+2Na-H, M+2H, M+3H, M+CH3OH+

```

ANEXO: TABLAS

Tablas Capítulo 3 Indicadores de hepatotoxicidad

Proteínas hepáticas

TABLA 3. 9 PORCENTAJE DE PROTEÍNAS (PROT) EN HÍGADO DE PACÚ, EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B1 EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Ensayo 3

Concentración AFB ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$ en alimento	Proteínas en hígado (mg de proteína 100gr ⁻¹)		
	Tiempo de Exposición		
	Día 30	Día 50	Día 70
o (control)	20,0±2,0 abc	20,4±2,8 abc	22,0±2,9 abc
1	21,0±3,8 abc	20,1±1,9 abc	21,7±4,9 abc
100	20,5±1,4 abc	20,2±1,3 bc	17,4±3,3 d
10000	20,4±3,2 abc	20,1±1,3 abc	17,1±1,7 d

Valores expresados como promedios±desviación estándar (n=9).

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, prueba de Tukey (p < 0.05)

EROD

TABLA 3. 10 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (EROD) EN HÍGADO DE PACÚ, EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B1 EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Ensayo 3

Concentración AFB ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$ en alimento	Actividad EROD (pmol/min.mg prot)		
	Tiempo de Exposición		
	Día 30	Día 50	Día 70
o (control)	13,7±4,8 bc	17,9±3,1 d	12,6±3,1 bc
1	16,9±5,3 cd	16,0±5,2 cd	8,1±3,4 a
100	16,2±3,5 bcd	16,0±2,9 cd	7,1±2,8 a
10000	13,8±3,9 bcd	12,5±3,2 b	5,5±2,4 a

Valores expresados como promedios±desviación estándar (n=9).

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, prueba de Tukey (p < 0,05)

BROD

TABLA 3. 11 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (BROD) EN HÍGADO DE PACÚ, EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B1 EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Ensayo 3

Concentración AFB ₁ µg kg ⁻¹ en alimento	Actividad BROD (pmol/min.mg)		
	Tiempo de Exposición		
	Día 30	Día 50	Día 70
o (control)	42,8±13,8 bc	42,7±12,7 bc	30,7±2,7 bc
1	49,3±15,9 d	44,2±16,3 bc	26,6±8,2 bc
100	40,6±10,1 bc	40,0±9,4 bc	25,6±7,3 bc
10000	37,6±10,7 bc	39,1±7,7 bc	19,0±2,4 a

Valores expresados como promedios±desviación estándar (n=9).

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, prueba de Tukey (p < 0,05)

GST

TABLA 3. 12 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (GST) EN HÍGADO DE PACÚ, EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B1 EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Ensayo 3

Concentración AFB ₁ µg kg ⁻¹ en alimento	Actividad GST (pmol/min.mg)		
	Tiempo de Exposición		
	Día 30	Día 50	Día 70
o (control)	59,6±10,0 d	49,6±5,7 abc	64,8±7,1 e
1	63,8±12,8 e	53,5±8,1 abcd	64,5±7,9 e
100	57,9±5,8 de	49,1±4,0 ab	50,6±6,5 abcd
10000	56,1±7,4 bcd	46,2±15,7 a	48,8±6,2 abc

Valores expresados como promedios±desviación estándar (n=9).

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, prueba de Tukey (p < 0,05)

ALT

TABLA 3. 13 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (ALT) EN HÍGADO DE PACÚ, EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B1 EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Ensayo 3

Concentración AFB ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$ en alimento	Actividad ALT (UI/mg)		
	Tiempo de Exposición		
	Día 30	Día 50	Día 70
o (control)	0,543 \pm 0,106 cd	0,520 \pm 0,058 cd	0,522 \pm 0,117 cd
1	0,512 \pm 0,116 d	0,456 \pm 0,079 bcd	0,369 \pm 0,053 ab
100	0,383 \pm 0,050 ab	0,383 \pm 0,098 ab	0,301 \pm 0,046 a
10000	0,367 \pm 0,040 ab	0,375 \pm 0,069 ab	0,202 \pm 0,050 a

Valores expresados como promedios \pm desviación estándar (n=9).

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, prueba de Tukey (p < 0,05)

AST

TABLA 3.14 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (AST) EN HÍGADO DE PACÚ, EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B1 EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Ensayo 3

Concentración AFB ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$ en alimento	Actividad AST (UI/mg)		
	Tiempo de Exposición		
	Día 30	Día 50	Día 70
o (control)	43,0 \pm 9,6 cd	40,3 \pm 10,0 bcd	39,5 \pm 6,3 cd
1	46,4 \pm 7,6 d	39,5 \pm 5,5 bcd	32,2 \pm 7,3 ab
100	36,2 \pm 8,0 abcd	36,4 \pm 5,6 abcd	25,1 \pm 6,1 ab
10000	33,7 \pm 7,7 b	33,7 \pm 5,9 bcd	22,2 \pm 4,3 a

Valores expresados como promedios \pm desviación estándar (n=9).

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, prueba de Tukey (p < 0,05)

ALP

TABLA 3. 15 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (ALP) EN HÍGADO DE PACÚ, EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B1 EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Ensayo 3

Concentración AFB ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$ en alimento	Actividad ALP (UI/mg)		
	Tiempo de Exposición		
	Día 30	Día 50	Día 70
0 (control)	4,7 \pm 1,2 bc	4,1 \pm 0,8 bc	3,2 \pm 0,9 a
1	4,3 \pm 1,0 abc	4,5 \pm 1,2 abc	5,1 \pm 0,6 bc
100	4,3 \pm 0,4 abc	4,7 \pm 1,3 bc	4,3 \pm 1,0 bc
10000	4,9 \pm 1,5 bc	5,0 \pm 1,1 c	4,0 \pm 0,6 ab

Valores expresados como promedios \pm desviación estándar (n=9).

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, prueba de Tukey (p < 0,05)

Tablas Capítulo 3 Efectos de AFB₁ sobre parámetros de desempeño

biológico

HSI

TABLA 3. 16 ÍNDICE HEPATOSOMÁTICO (HSI) EN PACÚES, EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B₁ EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Ensayo 3

Concentración AFB ₁ µg kg ⁻¹ en alimento	HSI %		
	Tiempo de Exposición		
	Día 30	Día 50	Día 70
o (control)	1,5±0,2 bc	1,5±0,2 bc	1,8±0,5 cd
1	1,5±0,3 bc	1,7±0,5 c	1,7±0,5 c
100	2,2±0,5 d	1,7±0,5 c	1,7±0,3 c
10000	1,6±0,4 c	1,1±0,2 ab	1,0±0,2 a

Valores expresados como promedios±desviación estándar (n=9).

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, prueba de Tukey (p < 0,05)

SGR

TABLA 3. 17 TASA DE CRECIMIENTO ESPECÍFICA (SGR) EN PACÚES, EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AFLATOXINA B₁ EN EL ALIMENTO DURANTE 3 PERIODOS DE EXPOSICIÓN.

Ensayo 3

Concentración AFB ₁ µg kg ⁻¹ en alimento	SGR% día ⁻¹		
	Tiempo de Exposición		
	Día 30	Día 50	Día 70
o (control)	0,74±0,13 a	0,78±0,13 a	0,84±0,09 ab
1	0,91±0,11 abc	0,76±0,15 a	0,76±0,15 a
100	1,14±0,11 d	0,86±0,16 ab	0,82±0,11 ab
10000	1,06±0,06 cd	0,99±0,04 bcd	0,77±0,04 a

Valores expresados como promedios±desviación estándar (n=9).

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos, prueba de Tukey (p < 0,05)

Tablas Capítulo 4

TABLA 4. 2 IONES SELECCIONADOS QUE PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS, POR LA EXPOSICIÓN A AFB₁ POR 70 DÍAS, DETECCIÓN EN PLASMA DE PACÚ MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASA FUENTE DE IONIZACIÓN ESI

Ionización	Rel. Masa/carga (M/Z)	Tiempo elusión (minutos)	p-value	Tendencia con la Concentración
Negativo	436,1	1,6	0,04	Disminuye
Negativo	450,0	2,2	0,01	Disminuye
Negativo	613,6	2,5	0,02	Disminuye
Negativo	387,2	4,3	0,01	Disminuye
Negativo	518,2	4,7	0,04	Disminuye
Negativo	525,6	5,3	0,00	Disminuye
Negativo	361,4	5,4	0,02	Disminuye
Negativo	452,4	5,5	0,04	Disminuye
Negativo	479,4	5,8	0,01	Disminuye
Negativo	929,0	5,8	0,01	Disminuye
Negativo	680,6	6,0	0,00	Disminuye
Negativo	589,5	6,0	0,02	Disminuye
Negativo	550,4	6,2	0,02	Disminuye
Negativo	794,6	6,6	0,05	Disminuye
Negativo	552,5	6,7	0,00	Disminuye
Negativo	544,4	7,2	0,01	Disminuye
Negativo	853,1	7,4	0,01	Aumenta
Negativo	982,7	7,4	0,02	Aumenta
Negativo	999,7	7,4	0,01	Disminuye
Negativo	919,3	7,6	0,00	Disminuye
Negativo	579,1	7,7	0,02	Disminuye
Negativo	859,0	8,0	0,01	Aumenta
Negativo	918,1	8,1	0,04	Disminuye
Negativo	775,2	8,3	0,05	Aumenta
Negativo	890,7	8,3	0,00	Aumenta
Negativo	840,7	8,4	0,01	Aumenta
Negativo	547,6	8,6	0,03	Aumenta
Negativo	669,5	8,7	0,02	Disminuye
Negativo	857,1	8,7	0,02	Aumenta
Negativo	86,1	8,8	0,01	Aumenta
Negativo	96,1	8,8	0,01	Disminuye
Negativo	908,1	8,9	0,01	Disminuye
Negativo	483,7	9,2	0,03	Aumenta
Negativo	434,2	9,2	0,03	Disminuye
Negativo	502,2	10,4	0,02	Aumenta
Negativo	299,8	11,7	0,02	Aumenta

Positivo	495,1	2,7	0,01	Aumenta
Positivo	785,4	2,8	0,00	Disminuye
Positivo	715,4	2,8	0,03	Aumenta
Positivo	772,6	2,9	0,03	Disminuye
Positivo	812,0	4,3	0,03	Aumenta
Positivo	544,8	4,9	0,00	Disminuye
Positivo	599,3	4,9	0,01	Disminuye
Positivo	881,5	4,9	0,01	Disminuye
Positivo	161,0	5,4	0,01	Aumenta
Positivo	676,2	5,7	0,01	Disminuye
Positivo	704,4	6,4	0,01	Disminuye
positivo	791,3	6,4	0,04	Disminuye
positivo	723,0	7,0	0,04	Aumenta
positivo	792,7	7,4	0,00	Aumenta
positivo	575,9	8,3	0,00	Disminuye
positivo	291,7	8,6	0,00	Disminuye
positivo	189,6	11,9	0,00	Disminuye

TABLA 4.4 RUTAS METABÓLICAS ALTERADAS PUTATIVAMENTE, POR LA EXPOSICIÓN A AFB₁ POR 70 DÍAS, DETECCIÓN EN PLASMA DE PACÚ MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASA FUENTE DE IONIZACIÓN ESI.

Pathway	Overlapping putative metabolites	%Overlapping putative metabolites	All metabolites	P-values
zymosterol biosynthesis	8	88,8%	9	8,6e-4
stearate biosynthesis	6	85,7%	7	1,0e-3
oleate biosynthesis	4	100,0%	4	1,0e-3
progesterone biosynthesis	4	100,0%	4	1,0e-3
α-tocopherol degradation	4	100,0%	4	1,0e-3
pyrimidine deoxyribonucleosides degradation	5	83,3%	6	1,1e-3
catecholamine biosynthesis	6	66,7%	9	1,3e-3
bupropion degradation	5	71,4%	7	1,4e-3
flavin biosynthesis	3	100,0%	3	1,5e-3
allopregnanolone biosynthesis	3	100,0%	3	1,5e-3
phytol degradation	6	75,0%	8	2,1e-3
noradrenaline and adrenaline degradation	12	92,3%	13	2,4e-3
ubiquinol-10 biosynthesis	11	84,6%	13	2,4e-3
histamine degradation	6	100,0%	6	2,5e-3
pyridoxal 5-phosphate salvage	6	100,0%	6	2,5e-3
heme biosynthesis from uroporphyrinogen-III I	5	83,3%	6	2,5e-3
creatine biosynthesis	4	66,7%	6	2,5e-3
pyrimidine ribonucleosides degradation	3	75,0%	4	3,1e-3
phenylalanine degradation/tyrosine biosynthesis	3	75,0%	4	3,1e-3
D-myo-inositol (1,4,5)-trisphosphate degradation	3	75,0%	4	3,1e-3
androgen biosynthesis	7	77,8%	9	3,6e-3
L-carnitine biosynthesis	4	80,0%	5	3,6e-3
purine ribonucleosides degradation to ribose-1-phosphate	6	66,7%	9	3,6e-3
glycine betaine degradation	5	55,6%	9	3,6e-3
UMP biosynthesis	5	55,6%	9	3,6e-3
S-adenosyl-L-methionine biosynthesis	2	100,0%	2	4,2e-3
sphingomyelin metabolism/ceramide salvage	2	100,0%	2	4,2e-3
lanosterol biosynthesis	2	100,0%	2	4,2e-3
tetrapyrrole biosynthesis	6	85,7%	7	4,8e-3
tryptophan degradation to 2-amino-3-carboxymuconate semialdehyde	5	71,4%	7	4,8e-3
guanosine nucleotides degradation	5	71,4%	7	4,8e-3
serotonin and melatonin biosynthesis	6	60,0%	10	6,7e-3
methionine degradation	4	80,0%	5	7,3e-3
pregnenolone biosynthesis	3	60,0%	5	7,3e-3
purine deoxyribonucleosides degradation	3	60,0%	5	7,3e-3
guanine and guanosine salvage	3	60,0%	5	7,3e-3
lysine degradation I (saccharopine pathway)	6	75,0%	8	1,0e-2

adenosine nucleotides degradation	5	62,5%	8	1,0e-2
lysine degradation II (piperolate pathway)	9	81,8%	11	1,3e-2
tRNA charging	11	57,9%	19	1,3e-2
GDP-L-fucose biosynthesis I (from GDP-D-mannose)	2	66,7%	3	1,4e-2
thymine degradation	2	66,7%	3	1,4e-2
methylthiopropionate biosynthesis	2	66,7%	3	1,4e-2
choline degradation	2	66,7%	3	1,4e-2
thyroid hormone biosynthesis	2	66,7%	3	1,4e-2
retinoate biosynthesis I	2	66,7%	3	1,4e-2
retinoate biosynthesis II	2	66,7%	3	1,4e-2
epoxysqualene biosynthesis	2	66,7%	3	1,4e-2
retinol biosynthesis	2	66,7%	3	1,4e-2
D-myo-inositol (1,4,5)-trisphosphate biosynthesis	2	66,7%	3	1,4e-2
D-glucuronate degradation	5	83,3%	6	1,8e-2
putrescine degradation III	5	83,3%	6	1,8e-2
methionine salvage	3	50,0%	6	1,8e-2
spermine and spermidine degradation I	3	50,0%	6	1,8e-2
eicosapentaenoate biosynthesis	7	77,8%	9	2,2e-2
leukotriene biosynthesis	5	55,6%	9	2,2e-2
bile acid biosynthesis, neutral pathway	26	72,2%	36	2,3e-2
uracil degradation	4	100,0%	4	3,9e-2
methylglyoxal degradation VI	4	100,0%	4	3,9e-2
Rapoport-Luebering glycolytic shunt	4	100,0%	4	3,9e-2
glucocorticoid biosynthesis	3	75,0%	4	3,9e-2
phenylethylamine degradation I	3	75,0%	4	3,9e-2
glycine cleavage	3	75,0%	4	3,9e-2
glycine biosynthesis	3	75,0%	4	3,9e-2
glycine/serine biosynthesis	2	50,0%	4	3,9e-2
thio-molybdenum cofactor biosynthesis	2	50,0%	4	3,9e-2
spermidine biosynthesis	2	50,0%	4	3,9e-2
lipoate biosynthesis and incorporation	2	50,0%	4	3,9e-2
melatonin degradation II	2	50,0%	4	3,9e-2
pentose phosphate pathway (oxidative branch)	2	50,0%	4	3,9e-2
serine biosynthesis (phosphorylated route)	5	71,4%	7	4,0e-2
2-amino-3-carboxymuconate semialdehyde degradation to glutaryl-CoA	4	57,1%	7	4,0e-2
adenine and adenosine salvage III	4	57,1%	7	4,0e-2

Las rutas fueron ordenadas de acuerdo p valor, en significancia decreciente.

Overlapping putative metabolites: Metabolitos putativos solapados en la via metabólica, de acuerdo con la base de Datos KEGG <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

ANEXO: Ensayos complementarios

Análisis de residuos de aflatoxinas en músculo

Una porción de las muestras de tejido recolectadas en los Ensayo 2 y 3 fue utilizada para analizar la concentración de residuos de aflatoxinas y corroborar la metabolización de la toxina, de acuerdo con la técnica descrita en el Capítulo 2.

Concentración de residuos de aflatoxinas en el músculo

Los análisis de residuos de aflatoxinas en músculo detectaron presencia de AFB₁ y AFM₁. Otros metabolitos de AFB₁, como AFB₂, AFG₁ y AFG₂ no fueron detectados en la musculatura evaluada. La concentración de residuos de AFB₁ y AFM₁ halladas en músculos de los ENSAYOS 2 Y 3 evaluada a distintos tiempos de exposición, junto a sus coeficientes de variación para cada concentración de alimento, se presentan en las Tablas 3.2 y 3.3.

En particular, se observaron concentraciones de aflatoxinas con valores similares a los informados en el Capítulo 2, para el ensayo de toxicocinética. Los valores obtenidos se incrementan en función del tiempo de exposición hasta alcanzar un valor máximo en musculo cercano a 0,2 µg kg⁻¹ y 0,05 µg kg⁻¹ para AFB₁ y AFM₁ respectivamente. Los resultados obtenidos en el Ensayo 3, presentaron concentraciones comparativamente menores, que los otros ensayos, probablemente debido a que los peces fueron privados de alimento 24 h antes de ser sacrificados.

TABLA 3.2. CONCENTRACIONES DE AFB₁ MEDIDAS EN MÚSCULO DE PACÚ EN LOS ENSAYOS 2 Y 3

	Concentración AFB ₁ µg kg ⁻¹ en alimento	Concentración de AFB ₁ en músculo (µg kg ⁻¹)			
		Tiempo de Exposición			
		Día 14	Día 29	Día 51	Día 71
Ensayo 2	o (control)	<LAQ			
	10.000	0,20±0,12			
	100.000	0,23±0,09			
Ensayo 3	o (control)		<LAQ	<LAQ	<LAQ
	1		<LAQ	<LAQ	<LAQ
	100		<LAQ	0,01±0,00	0,11±0,04
	10.000		<LAQ	0,08±0,01	0,14±0,04

Los valores se expresan como el promedio± el desvío estándar (N Ensayo 2=6 Ensayo 3=9 Ensayo 1=6)
 LAQ = Limite de Cuantificación analítico

TABLA 3.3. CONCENTRACIONES DE AFM₁ MEDIDAS EN MÚSCULO DE PACÚ EN LOS ENSAYOS 2 Y 3

	Concentración AFB ₁ µg kg ⁻¹ en alimento	Concentración de AFM ₁ en músculo (µg kg ⁻¹)			
		Tiempo de Exposición			
		Día 14	Día 29	Día 51	Día 71
Ensayo 2	0 (control)	<LAQ			
	10.000	0,04±0,01			
	100.000	0,05±0,02			
Ensayo 3	0 (control)		<LAQ	<LAQ	<LAQ
	1		<LAQ	<LAQ	<LAQ
	100		<LAQ	<LAQ	<LAQ
	10.000		<LAQ	<LAQ	<LAQ

Los valores se expresan como el promedio± el desvío estándar (N Ensayo 2=6 Ensayo 3=9 Ensayo 1=6)

LAQ = Limite de Cuantificación analítico