

Impacto de *Pichia kudriavzevii* en la histopatología de los órganos inmunes e intestino delgado de pollos parrilleros alimentados con monensina

Alejandra Magnoli^{1,2}, Valeria Poloni^{2,3}, Lorenzo Rosales³, Andrea Cristofolini^{2,4}, Matías Caverzan⁵, Valeria Coniglio¹, María Eugenia Ortiz¹, Fátima Candelaria de la Torre¹ y Lilia Cavaglieri^{2,3*}

1- Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina

2- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

3- Departamento de Microbiología e Inmunología Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto

4- Área de Microscopía Electrónica, Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina

5- Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina.

Palabras clave

coccidiostático
levadura
histopatología
pollos parrilleros

Resumen. El objetivo del estudio fue evaluar el impacto de *Pichia kudriavzevii* sobre la histopatología de órganos inmunes e intestino delgado de pollos parrilleros alimentados con monensina (MON). Las aves (4 tratamientos/3 réplicas, 5 pollos parrilleros/réplica, total 60) fueron alojadas en jaulas metálicas; las dietas experimentales fueron: tratamiento (T) T1: dieta basal (DB); T2: DB + MON (50 mg/kg); T3: DB + *P. kudriavzevii* (1 g levadura/kg alimento); T4: DB + MON + *P. kudriavzevii*. El período experimental fue 28 días. Al final del ensayo se extrajeron bazo, timo, bolsa de Fabricio (BF) e intestino delgado para evaluar los cambios histopatológicos y determinar el peso absoluto y relativo. Los pesos del bazo no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$); cuando se adicionó MON los valores mostraron una tendencia negativa. Los pesos del timo disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) en el T2. Los valores en bazo, timo, BF y en el radio bazo/BF mostraron una tendencia positiva con la adición de la levadura. La histopatología del timo en T2 mostró alteración en la relación corteza-medular y T4 mostró un desarrollo de la corteza menos evidente. Las muestras de bazo de T2 mostraron congestión esplénica y células con núcleos cariorexis; T4 mostró una menor congestión. En T2 disminuyó la altura de las vellosidades y el número de células caliciformes; el número de linfocitos intraepiteliales fue normal. La adición de MON afectó negativamente los órganos inmunes e intestino delgado, atenuados con la adición de la levadura. Una concentración mayor de levadura podría contrarrestar totalmente los efectos del coccidiostático.

Citar como: Magnoli, A., Poloni, V., Rosales, L., Cristofolini, A., Caverzan, M., Coniglio V., Ortiz M., De la Torre, F. y Cavaglieri, L. (2020). Revista Científica FAV-UNRC *Ab Intus* 5(3) 00-00.

*Autora para correspondencia: Lilia Cavaglieri. E-mail: lcavaglieri@exa.unrc.edu.ar Ruta Nacional 36, Km. 601, 5804 Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Financiamiento: Este estudio fue subsidiado por SECyT - UNRC 331/16, PIP-CONICET GI 11220120100156 y PICT 2033/15.

Impact of *Pichia kudriavzevii* on the histopathology of the immune organs and small intestine of broiler chickens fed with monensin

Keywords

coccidiostatic
yeast
histopathology
broilers chicken

Abstract. This study aimed to evaluate the impact of *Pichia kudriavzevii* on immune organs and small intestine histopathological changes of broiler chickens feed with monensin (MON). Birds (3 replicates/4 treatments, 5 broilers chickens/replicate, total: 60) were housed in metallic cages and experimental diets were: treatment (T) T1: basal diet (B); T2: B + MON (50 mg/kg); T3: B + *P. kudriavzevii* (1 g yeast/kg feed); T4: B + MON + *P. kudriavzevii*. The experimental period was 28 days. At the end of the feeding trial, small intestine, spleen, thymus and bursa of Fabricius (BF) were removed to evaluate histopathological changes; relative and absolute weights were determined. Spleen weights did not show significant differences ($p < 0.05$) while these values showed a negative trend when MON was added. Thymus weights showed a significant decrease ($p < 0.05$) in T2. Spleen, thymus, BF and spleen/BF radius values showed a positive trend with the addition of yeast. The histopathology of the thymus in T2 showed an alteration in the cortex-medullary relationship, T4 showed less evident cortex development. Spleen samples from T2 showed splenic congestion and cells with cariorexis nuclei, T4 showed less congestion. A decrease in villus height and less goblet cells, with normal numbers of intraepithelial lymphocytes were observed in T2. The addition of 50 mg / kg MON negatively affected the immune organs and the small intestine. These changes were attenuated with the addition of yeast. In future studies, these negative effects of coccidiostat could be fully counteracted with a higher yeast concentration.

INTRODUCCIÓN

La coccidiosis es una enfermedad parasitaria protozoaria causada por varias especies de *Eimeria sp.* entre las más importantes se encuentran *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, las cuales afectan particularmente a las aves de corral (Davis y Gookin, 2018). La coccidiosis está extendida mundialmente y es una de las enfermedades más costosas en términos de prevención y pérdida productivas para la industria avícola. Durante más de 50 años, la principal medida fue la utilización de alimentación profiláctica con anticoccidiales, considerados aditivos obligatorios en las dietas de pollos parrilleros criados en sistemas intensivos o superintensivos (Markiewicz *et al.*, 2014). La monensina (MON), fue el primer ionóforo utilizado en la industria avícola, para el control de la coccidiosis en aves. La monensina es un ionóforo

carboxílico selectivo de Na^+ que forma complejos catiónicos solubles en lípidos que pueden atravesar las membranas celulares rápidamente (EFSA, 2008). En la década de los 80 se realizaron varios estudios demostrando su toxicidad en bovinos, aves de corral, ovejas, caballos y perros. Los órganos diana de la intoxicación por monensina son los músculos esqueléticos y cardíacos. La toxicidad de la monensina se debe principalmente a su capacidad para aumentar la concentración intracelular de sodio (Markiewicz *et al.*, 2014).

Otro de los problemas causantes de pérdidas económicas importantes en la producción avícola es la contaminación con micotoxinas de los alimentos (Magnoli *et al.*, 2019). Se han propuesto numerosos métodos físicos, químicos y biológicos para desintoxicar, degradar o inactivar a las micotoxinas en los

alimentos contaminados. Entre ellos, los métodos biológicos, utilizando microorganismos y sus metabolitos, serían un enfoque prometedor debido a su desintoxicación específica, eficiente y ambientalmente racional (Roto *et al.*, 2015; Magnoli *et al.*, 2017, 2018; Martínez *et al.*, 2017). Otros estudios han indicado que las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* se pueden agregar a los alimentos contaminados para unir selectivamente las micotoxinas (Yiannikouris *et al.*, 2006). Para reducir las pérdidas económicas del sector, continuamente se están estudiando alternativas nutricionales como la utilización de bacterias y levaduras como probióticos y prebióticos los cuales han demostrado ser efectivos en favorecer el crecimiento de la biota intestinal benéfica y algunos como absorbentes de micotoxinas (Sarangi *et al.*, 2016; Magnoli *et al.*, 2016, 2017, 2018; Martínez *et al.*, 2017; Anadón *et al.*, 2019; Poloni *et al.*, 2020). Sin embargo, estos productos alternativos solos no han proporcionado una solución efectiva. Es por ello que en la actualidad se está estudiando los efectos de la adición conjunta de bacterias, levaduras, enzimas, coccidiostáticos y fitobioticos entre otros (Mehdi *et al.*, 2018; Anadón *et al.*, 2019; Poloni *et al.*, 2020).

En estudios previos Magnoli *et al.* (2011a,b) han demostrado que monensina puede reducir la efectividad de la bentonita de sodio (NaB) para adsorber aflatoxina B₁ (AFB₁). Más tarde y en contraste, De Mil *et al.* (2017) mostraron que los aglutinantes de micotoxinas no influyeron en la biodisponibilidad oral de los coccidiostáticos en pollos de engorde. Aunque diferentes trabajos han demostrado la influencia de los absorbentes no biológicos (NaB) en la adsorción de AFB₁ en presencia de monensina, no hay estudios en la literatura que demuestren la posible interacción o los efectos entre los absorbentes biológicos como la levadura y la monensina.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de *Pichia kudriavzevii* en la histopatología de los órganos inmunes e intestino delgado de pollos parrilleros alimentados con monensina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo de trabajo y las técnicas utilizadas cumplen con las regulaciones del Subcomité de Bioética Animal bajo el Comité de Ética de Investigación Científica, según lo establecido en la Resolución 253/10 del Consejo Superior de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Aditivos utilizados

Monensina: se adiciono una fuente comercial de monensina sódica (MON) C₃₆H₆₂O₁₁ (20% de MON granular, Ensol, Buenos Aires, Argentina) a la dieta basal y se homogeneizó para proporcionar una concentración de 50 mg de MON/kg de alimento.

Levadura: *Pichia kudriavzevii* (estado teleomórfico de *Candida krusei*) se obtuvo del Centro de Recolección de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. Anteriormente se aisló de los alimentos de pollos parrilleros y se caracterizó por la secuenciación de 26S D1/D2 rRNA dominio genético. Las secuencias de genes parciales de 26S-ARNr (dominios D1 / D2) se amplificaron usando cebadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') de acuerdo con Kurtzman y Robnett (2003).

La selección de la cepa se basó en su capacidad para unir AFB₁ *in vitro* (Magnoli *et al.*, 2016). *P. kudriavzevii* se produjo en 150 ml de caldo de levadura peptona dextrosa (YPD) en Erlenmeyer inoculados con 1 ml de un cultivo puro de 24 h. Los Erlenmeyer se incubaron en un agitador orbital (150 rpm) a 37 °C durante 24 h. Luego, las células se recogieron por centrifugación (6.000 rpm, 5 min) y los pellets se liofilizaron y homogeneizaron para incorporarlos a la dieta basal con el fin de proporcionar una concentración de 1 g de levadura/kg de alimento (0,1%).

Diseño experimental: se utilizaron pollitos machos de un día de edad (Ross) vacunados contra la enfermedad de Mareks obtenidos de un criadero comercial y se mantuvieron bajo iluminación fluorescente continua con alimento y agua *ad libitum* durante todo el experimento. El día 1 del experimento, se pesaron individualmente y se seleccionaron al azar

un total de 60 aves (4 tratamientos/3 réplicas, 5 pollos parrilleros/réplica). Durante el período experimental (28 días), los pollos parrilleros recibieron la dieta correspondiente a cada tratamiento. Para formular las diferentes dietas experimentales, se utilizó una dieta iniciadora basada en harina de maíz y soja (dieta basal) que cumplía con los requisitos de las Directrices Ross 308 (Aviagen, Ross 308 Broiler, 2014). Las diferentes dietas se prepararon mezclando previamente la levadura liofilizada y luego mezclándolas con la dieta basal en un mezclador industrial. El diseño experimental consistió en 4 tratamientos, cada tratamiento se formuló de la siguiente manera: tratamiento (T) T1: dieta basal (DB); T2: DB + MON (50 mg/kg); T3: DB + P. kudriavzevii (1 g de levadura/kg de alimento); T4: DB + MON + P. kudriavzevii. Los pollos parrilleros se pesaron al inicio, semanalmente y al final del estudio y se monitorearon diariamente para detectar signos de morbilidad y mortalidad. Al final del período experimental, se extrajo bazo, timo, bolsa de Fabricio e intestino delgado para evaluar los cambios histopatológicos. Además, los órganos inmunes fueron pesados para determinar el peso relativo y absoluto de los mismos.

Determinación de la histopatología de órganos inmunes e intestino delgado: cuando los pollos parrilleros alcanzaron la edad de 33 días, el ensayo terminó, se seleccionaron al azar 3 pollos de cada réplica de cada tratamiento y se sacrificaron por dislocación cervical. Luego se realizó una necropsia detallada. Después del examen patológico, se extrajo bazo, timo y bolsa de Fabricio para la observación histológica y se pesaron, (n = 9) de cada tratamiento (3 de cada réplica de cada órgano) se seleccionaron y fijaron en formalina tamponada neutra al 10%. Los tejidos fijados se recortaron, se embebieron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina para su examen histopatológico por microscopía óptica (MO). Microscópicamente, la extensión del daño de los órganos inmunológicos se evaluó según Peng *et al.* (2015). En el ensayo experimental se evaluaron otros parámetros, cuyos resultados fueron publicados previamente (Magnoli *et al.*, 2018; 2019). El peso relativo se calculó mediante la siguiente fórmula: peso relativo = peso del órgano (g) / peso corporal (g).

Se tomaron muestras de intestino delgado (duodeno) de aproximadamente 6 mm² se fijaron en formaldehído salino tamponado al 4% (v/v) pH 7,2-7,4 a 4 °C, deshidratado en una serie graduada de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%) y soluciones de xileno, embebidas en parafina y cortadas en cortes seriados histológicos de ± 4 µm. Las secciones histológicas se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E) para análisis microscópico.

Las imágenes digitales se capturaron con un microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Thornwood, NY) equipado con una cámara digital Power Shot G6 de 7.1 megapíxeles de alta resolución (Canon INC, Japón). El análisis de imagen digital y las mediciones morfométricas se realizaron con Axio visión AxioVs40 V4.6.3.0. software (Carl Zeiss, Gotinga, Alemania).

Microscópicamente, la extensión del daño intestinal y la inflamación se evaluó de acuerdo con Del Carmen *et al.* (2013), utilizando un sistema de clasificación histopatológico estándar: hallazgos histológicos idénticos a los normales (grado 0); infiltrado inflamatorio leve de la mucosa y/o submucosa (mezcla de neutrófilos) y edema, erosiones puntuales de la mucosa a menudo asociadas con la proliferación capilar, muscular de la mucosa intacta (grado 1); cambios de grado 1 que involucran el 50% de la muestra (grado 2); infiltrado inflamatorio prominente y edema (predominantemente neutrófilos) frecuentemente con áreas más profundas de ulceración que se extienden a través de la muscular de la mucosa hacia la submucosa; células inflamatorias raras que invaden la muscular de la lámina propia pero sin necrosis muscular (grado 3); cambios de grado 3 que involucran el 50% de la muestra (grado 4); ulceración extensa con necrosis coagulativa bordeada inferiormente por numerosos neutrófilos y un menor número de células mononucleares; la necrosis se extiende profundamente en la muscular propia (grado 5); cambios de grado 5 que involucran el 50% de la muestra (grado 6). Los análisis a ciegas fueron realizados por dos científicos diferentes.

Análisis estadístico de los datos: los datos fueron analizados por un modelo general y lineal mixto (GLMM) (versión 2.03 para Windows 2012; Universidad de Córdoba, Argentina) software 2008 (Di

Rienzo *et al.*, 2008). Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA). Las medias y el error estándar (SEM) se compararon utilizando la prueba menos significativa protegida de Fisher (LSD) ($p < 0,05$).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los pesos relativos y absolutos de bazo, timo y bolsa de Fabricio (BF) y el radio bazo/BF de los pollos parrilleros suplementados con los diferentes tratamientos. Los pesos relativos y absolutos del bazo no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos comparados con el tratamiento control (T1) ($p < 0,05$), sin embargo, los valores muestran una tendencia negativa en ambos parámetros evaluados cuando se adiciono MON (T2). Por otro lado, la adición de levadura (T4) mostro una tendencia positiva de los valores tanto para el peso relativo como absoluto. En cuanto a los pesos relativos y absolutos del timo todos los tra-

tamientos mostraron diferencias significativas comparadas con el tratamiento control ($p < 0,05$). Los pesos de los diferentes tratamientos fueron menores comparado con los pesos del tratamiento control. La adición de MON (T2) mostro una disminución significativa de los pesos ($p < 0,05$) comparados con los pesos del tratamiento control (T1), sin embargo, cuando se adiciono en forma conjunta levadura y MON (T4) no mostraron diferencias significativas al compararlas con el tratamiento 2 (MON), si bien no hubo diferencias significativas, los valores de los pesos del timo mostraron una tendencia positiva cuando se adiciono la levadura. Por otro lado, los pesos relativos y absolutos de la BF no mostraron diferencias significativas comparados con el tratamiento control ($p < 0,05$). Los valores del radio bazo/bolsa de Fabricio, si bien, no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), se observa nuevamente una tendencia positiva de los valores con la adición de la levadura al compararlo con el tratamiento con MON (T4).

Tratamientos	Bazo		Timo		Bolsa de Fabricio		Radio bazo/bolsa
	Peso relativo (g)	Peso absoluto (g)	Peso relativo (g)	Peso absoluto (g)	Peso relativo (g)	Peso absoluto (g)	
T1	1,37 ± 0,24 ^{ab}	1,38 ± 0,27 ^a	3,06 ± 0,99 ^c	3,11 ± 1,06 ^c	3,38 ± 0,52 ^{ab}	3,43 ± 0,62 ^{ab}	0,41 ± 0,07 ^{abc}
T2	1,15 ± 0,25 ^a	1,23 ± 0,26 ^a	2,41 ± 0,84 ^b	2,51 ± 0,64 ^b	3,58 ± 0,98 ^{bc}	3,83 ± 0,93 ^{bc}	0,33 ± 0,08 ^a
T3	1,51 ± 0,30 ^b	1,55 ± 0,37 ^a	1,94 ± 0,59 ^{ab}	1,96 ± 0,53 ^{ab}	3,56 ± 1,12 ^{bc}	3,65 ± 1,12 ^{abc}	0,44 ± 0,11 ^{abc}
T4	1,30 ± 0,25 ^{ab}	1,40 ± 0,22 ^a	1,94 ± 0,59 ^{ab}	2,06 ± 0,52 ^{ab}	2,94 ± 0,56 ^{ab}	3,17 ± 0,58 ^{ab}	0,46 ± 0,14 ^{bc}

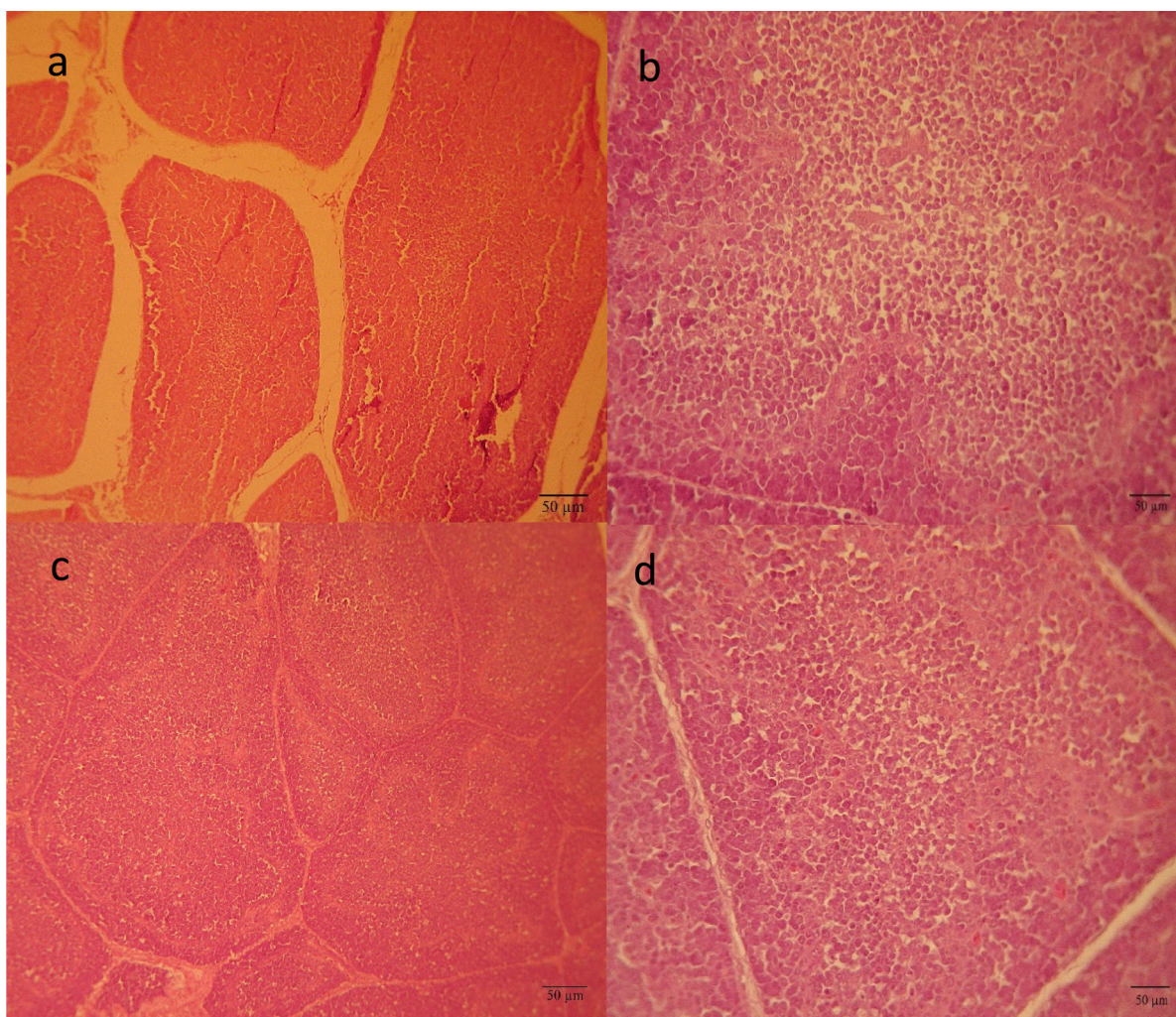
Tabla 1. Pesos relativos y absolutos de bazo, timo y bolsa de Fabricio y radio bazo/bolsa de Fabricio en pollos parrilleros suplementados con los diferentes tratamientos.

T1: dieta basal (B); **T2:** B + MON; **T3:** B + *P. kudriavzevii*; **T4:** B + MON + *P. kudriavzevii*; Monensina (MON 50 mg/kg); *P. kudriavzevii* (1 g levadura/kg de alimento).

Los datos se expresan como media ± ES. Los superíndices dentro de las filas indican diferencia significativa ($p < 0,05$), según el test de Fisher; $n = 9$.

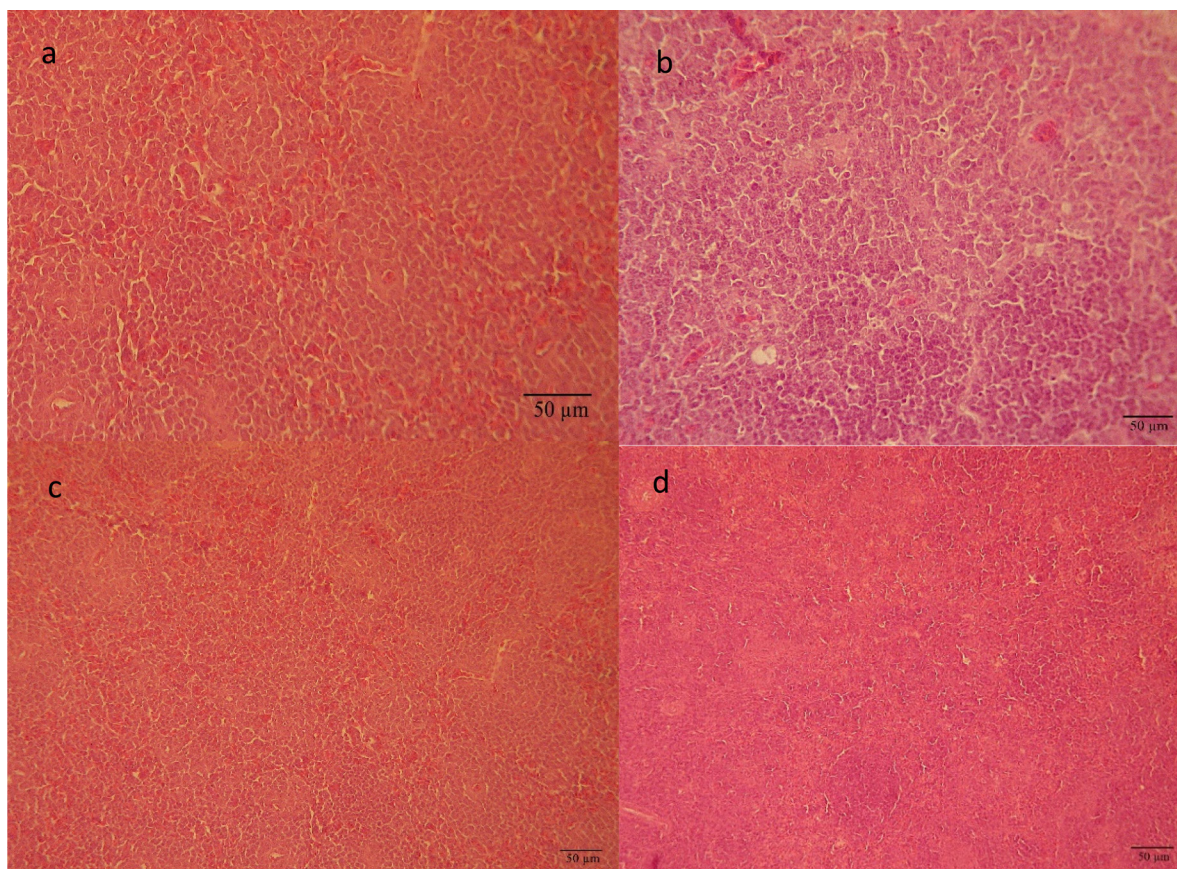
En la Figura 1 se muestran los cambios histopatológicos de timo de pollos parrilleros correspondiente a los diferentes tratamientos. La Figura 1a muestra los cambios histopatológicos en timo de los pollos parrilleros correspondiente al tratamiento control observándose una apariencia normal del mismo. El timo de los pollos parrilleros alimentados con MON (figura 1b) mostraron una alteración evidente en la relación corteza-medular, siendo menor el diámetro de la corteza (menos basofilia) y mayor el diámetro de la médula, lo que sugiere un menor desarrollo de células inmunes maduras, responsables de constituir la corteza del timo. Mientras que, las muestras de timo de los animales alimentados con levadura (T3) no mostraron alteraciones en el parénquima, ni en la relación corteza-médula (Figura 1c). Por otro lado, el timo de los animales alimentados con MON mas el agregado de levadura (T4), presentaron cambios similares a las muestras de los animales alimentados con MON sola (T2), pero con un desarrollo menor de la corteza del timo menos evidente (figura 1d).

La Figura 2 muestra los cambios histopatológicos en el bazo de los pollos parrilleros suplementados con los diferentes tratamientos. Las muestras de bazo de los pollos parrilleros alimentados con dieta basal (T1) mostraron una apariencia normal (Figura 2a). Las muestras de bazo de los animales correspondiente al tratamiento 2 (MON) mostraron una congestión esplénica y algunas células con núcleos de cariorrexis (Figura 2b). Mientras que, las muestras de bazo de los pollos parrilleros alimentados con levadura sola (T3) mostraron una ligera congestión de la pulpa roja, exhibiendo una gran cantidad de glóbulos rojos en los capilares (Figura 2c). Por otro lado, las muestras de bazo de los animales correspondientes al T4 (DB + MON + *P. kudriavzevii*) presentaron cambios similares a las muestras de bazo del tratamiento 2 (MON), pero con una congestión menor (Figura 2d).



a) Tratamiento 1(DB) (10 X); **b)** Tratamiento 2 (DB +MON) 40x; **c)** Tratamiento 3 (DB + *P. kudriavzevii*) (10 X); **d)** tratamiento 4 (DB +MON + *P. kudriavzevii*) 40x.

Figura 1 Cambios histopatológicos en el timo de los pollos parrilleros suplementados con los diferentes tratamientos.

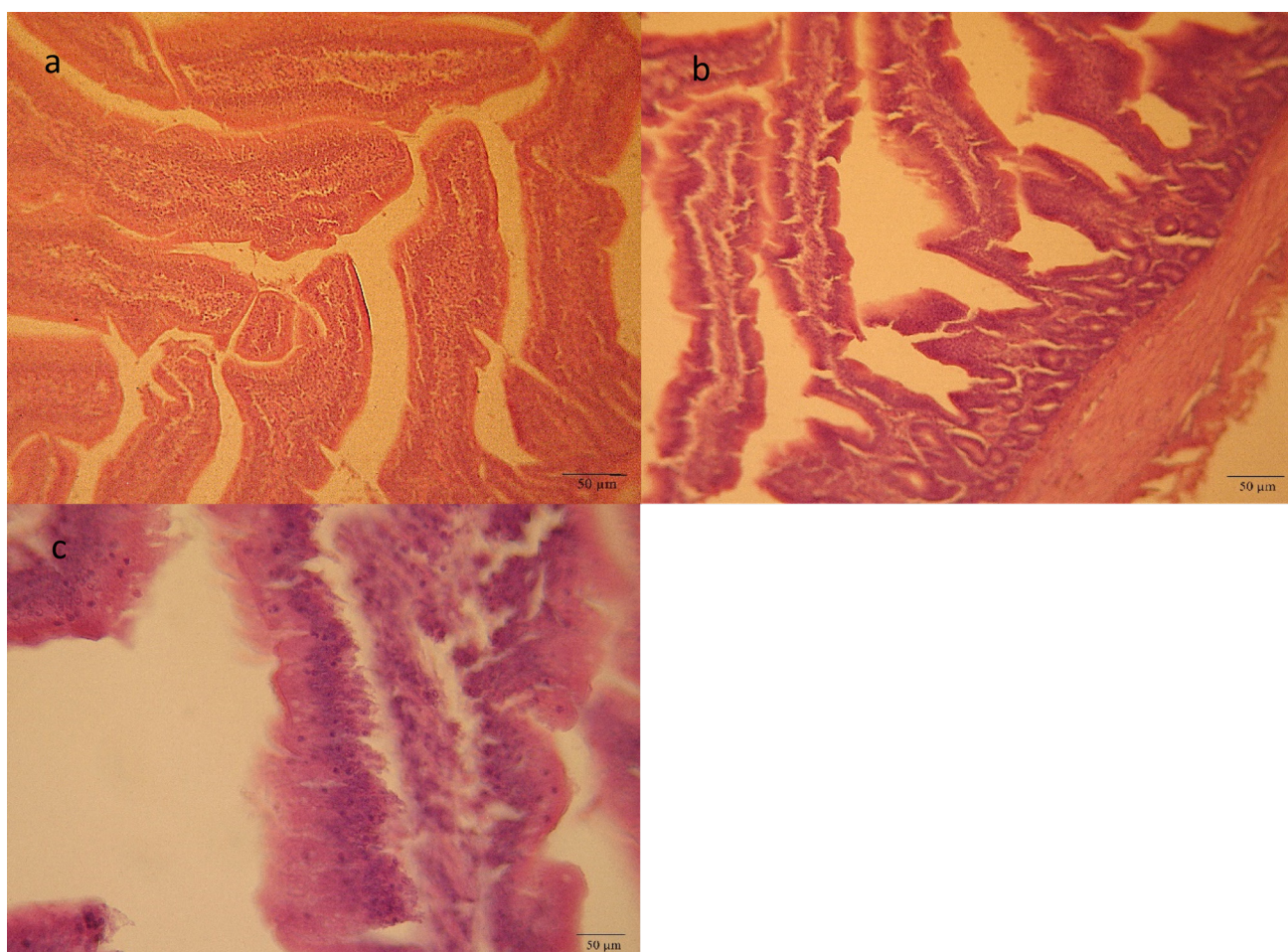


a) tratamiento 1 (DB), 25 X); **b)** Tratamiento 2 (DB +MON), 40 x; **c)** Tratamiento 3 (DB + *P. kudriavzevii*), 25 x; **d)** tratamiento 4 (DB + *P. kudriavzevii* +MON) 25x)

Figura 2. Cambios histopatológicos en el bazo de los pollos parrilleros suplementados con los diferentes tratamientos

La Figura 3 muestra los cambios histopatológicos de intestino delgado de los pollos parrilleros suplementados con los diferentes tratamientos. En la Figura 3a se observó una longitud normal de las vellosidades, con la presencia de células caliciformes en el epitelio el intestino delgado de los pollos parrilleros alimentados con dieta basal (T1). En la Figura 3b y 3c correspondiente al tratamiento 2 (MON) se observó una disminución en la altura de las vellosidades y un menor número de células caliciformes, con un nú-

mero de linfocitos intraepiteliales normales (No se observaron lesiones en el intestino delgado de los pollos parrilleros correspondientes al T4 (DB + MON + *P. kudriavzevii*). Por otro lado, en ningún tratamiento se observó la presencia de células inflamatorias (mononucleares y polimorfonucleares) en el tejido conectivo de la lámina de la mucosa y submucosa de las vellosidades. Además, no hubo alteraciones en los vasos sanguíneos indicando hiperemia.



a) Tratamiento 1 (DB) 10 x; b) Tratamiento 2 (MON) 10 x; c) Tratamiento 2 (MON) 40 x.

Figura 3. cambios histopatológicos de intestino delgado de los pollos parrilleros suplementados con los diferentes tratamientos.

DISCUSIÓN

Los anticoccidiostáticos son usados ampliamente en la industria avícola, siendo la monensina sódica un ionóforo autorizado para su uso en pollos de engorde (autorización hasta el 30 de julio de 2014) (Reglamento de la Comisión 2004) para controlar la enteritis necrótica (Del Cacho y Bosch, 2014). Los efectos tóxicos de los ionóforos en las aves sobre los órganos inmunes e intestino son inexistentes, se sabe que su principal efecto tóxico es sobre el tejido muscular produciendo parálisis parcial o completa, pudiendo presentar signos respiratorios ya que afecta también a los músculos de la tráquea (Dowling, 1992). Sin embargo, en estudios previos llevados a cabo por Magnoli *et al.*, 2011a,b donde se utilizaron pollos parrilleros alimentados con diferentes dietas experimentales conteniendo absorbentes no bioló-

gicos (bentonita sódica), monensina (MON) (50 mg/kg) y aflatoxina B₁ (AFB₁) (100µg/Kg) solos y en forma conjunta, se observaron cambios macroscópicos e histopatológicos en los hígados de los pollos parrilleros alimentados con MON sola. Por otro lado, los hígados de los pollos parrilleros alimentados con la dieta en forma conjunta de MON y AFB₁ mostraron lesiones más severas, demostrando un potencial efecto tóxico de la MON sobre el hígado, y un efecto aditivo cuando la toxina estaba presente. Además, se demostró que MON disminuyó la capacidad de adsorción de la toxina por parte del absorbente no biológico utilizado.

En la actualidad hay una preocupación creciente sobre los patógenos alimenticios que se transmiten desde los animales de granja a la población humana. Debido a la ausencia de estrategias alternativas,

la mayoría de los intentos para controlar la biota intestinal en pollos se ha hecho hasta ahora con el uso de antibióticos. Sin embargo, la reciente y creciente preocupación por la resistencia a los antibióticos a conducido a la prohibición del uso profiláctico de algunos de ellos. Por lo expuesto anteriormente se plantea el objetivo del presente estudio el cual fue evaluar el impacto de *P. kudriavzevii* sobre los cambios histopatológicos en órganos inmunes e intestino delgado de pollos parrilleros expuestos a monensina.

En el presente estudio, la administración de MON a la dieta de los pollos parrilleros mostró una tendencia negativa en los pesos relativos y absolutos de los órganos inmunes. El peso relativo de los órganos linfoides es un parámetro utilizado para predecir el estatus inmunitario del animal (Chichlowski *et al.*, 2007; Ashayerizadeh *et al.*, 2009). Por ejemplo, la disminución del peso del timo depende de muchos factores entre ellos la edad del ave (involucionando con la edad), la hipoplasia, aplasia y menor diferenciación de linfocitos maduros. En cuanto a la disminución del peso del bazo podría deberse a dos causas, la primera a una falta de parénquima y la segunda a una disminución de la circulación sanguínea en el órgano. Así, la tendencia negativa de los pesos del bazo y timo encontrados con el nivel de inclusión de 50mg/kg de monensina, podrían indicar mayor susceptibilidad de los animales a algún patógeno. Sin embargo, como el peso de los órganos linfoides es un parámetro inmunitario secundario, este debe ser correlacionado con las demás medidas de inmunidad.

Los cambios histopatológicos de los órganos linfoides son una herramienta diagnóstica en los cuadros de inmunosupresión de las aves (Solano *et al.*, 1986). En la presente investigación se evaluaron las lesiones de los órganos inmunes como timo y bazo. La alteración en la relación corteza-medular, encontrados en el timo de los pollos parrilleros alimentados con MON podría sugerir un menor desarrollo de células inmunes maduras, responsables de constituir la corteza del timo. Por otro lado, la congestión esplénica y algunas células con núcleos de cariorexis en presencia de monensina en las muestras de bazo podrían indicar un efecto negativo sobre la producción de células correspondiente a la línea blanca.

El tracto gastrointestinal es el primer órgano que entra en contacto con componentes de origen dietético y se espera que se vea afectado por la MON con mayor efecto negativo en comparación con otros órganos. Además, la integridad de las vellosidades intestinales juega un papel crucial en la absorción de nutrientes y en el crecimiento del animal. Los cambios histopatológicos encontrados en el intestino delgado de los pollos parrilleros alimentados con MON mostraron una disminución en la altura de las vellosidades y un menor número de células caliciformes, con un número de linfocitos intraepiteliales normales. Estas alteraciones podrían estar afectando la óptima adsorción de los nutrientes como así también la adhesión de los microorganismos patógenos a la superficie de la vellosidad. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron una tendencia negativa de los parámetros evaluados cuando está presente la MON mientras que la adición de levadura mostro una tendencia positiva. Estos resultados están parcialmente de acuerdo con otros estudios, donde el consumo de una sustancia tóxica conocida como las micotoxinas afecto los pesos de los órganos inmunes como así también la histología de los órganos inmunes e intestino (Peng *et al.*, 2015; Lakkawar *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018).

CONCLUSIÓN

En conclusión, la adición de 50 mg/kg de MON afectó negativamente a los órganos inmunes e intestino delgado. Estos cambios fueron atenuados con la adición de la levadura. En futuros trabajos los efectos negativos del coccidiostático podrían ser contrarrestados totalmente con una concentración mayor de levadura.

Declaración de conflicto de interés

Ninguno de los autores tiene ninguna relación financiera o personal que pueda influir o sesgar de manera inapropiada el contenido del artículo.

Financiamiento

Este estudio fue subsidiado por SECyT - UNRC 331/16, PIP-CONICET GI 11220120100156 y PICT 2033/15.

REFERENCIAS

- Anadón, A., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M.R.; Aranzazu Martínez, M. (2019). Prebiotics and Probiotics in Feed and Animal Health, Nutraceuticals in Veterinary Medicine
- Ashayerizadeh, O., Dastar, B., Shams Shargh, M., Ashayerizadeh, A., Mamooee, M. (2009). Influence of antibiotic, prebiotic and probiotic supplementation to diets on carcass characteristics, hematological indices and internal organ size of young broiler chickens. *J Anim Vet Adv* 8: 1772–1776.
- Aviagen Ross 308 Broiler, nutrition specification. Newbridge. Midlothian, Scotland, UK: Ross Breeders Limited (2014)
- Chichlowski, M., Croom, J., McBride, B.W., Daniel, L., Davis, G., Koci, M.D. (2007). Direct-fed microbial primac and salinomycin modulate whole-body and intestinal oxygen consumption and intestinal mucosal cytokine production in the broiler chick. *Poult Sci* 86: 1100–1106.
- (EC) Reglamento de la comisión No 1356/2004. Concerning the authorisation for 10 years of the additive 'Elancoban' in feedingstuffs, belonging to the group of coccidiostats and other medicinal substances. *OJ L* 251, 27.7. (2004), p. 6.
- Davis, J., Gookin, J. (2018). Antiprotozoan Drugs. In: Riviere, J. and Papich, R. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 10^a ed. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. USA, 1128–1165
- De Mil, T., Devreese, M., Maes, A., De Saeger, S., De Backer, P., Croubels, S. (2017). Influence of mycotoxin binders on the oral bioavailability of tylosin, doxycycline, diclazuril, and salinomycin in fed broiler chickens. *Poultry Sci*. 96: 2137–2144.
- Del Cacho, E. y Bosch, M. (2014). Coccidiosis: la enfermedad, consecuencias y tratamiento. *Selecciones Avícolas* 56: 13–17.
- Del Carmen, S., Zurita-Turk, S.M., Alvarenga Lima, F., Coelho Dos Santos, R.S., Leclercq, S.Y., Chatel, J.M., Azevedo, V., De Moreno de Leblanc, A., Miyoshi, A., Leblanc, J.G. (2013). A novel interleukin-10 DNA mucosal delivery system attenuates intestinal inflammation in a mouse model. *Eur J Inflamm* 3: 641–654.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2008), Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Dowling, L. (1992). Ionophore toxicity in chickens: A review of pathology and diagnosis. *Avian Pathology* 21: 355–368.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2008). Opinion of European Commission on Cross-contamination of non-target feedingstuffs by salinomycin authorised for use as a feed additive. *EFSA J*. 591: 1–38.
- Hu, P., Zuo, Z., Li, H., Wang, F., Peng, X., Fang, J., Cui, H., Gao, C., Song, H., Zhou, Y., Chen, Z. (2018). The molecular mechanism of cell cycle arrest in the Bursa of Fabricius in chick exposed to Aflatoxin B1. *Sci. Rep.* 8: 1770. ISBN 978-3-030-04623-1.
- Kurtzman, C.P. y Robnett, C.J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the Saccharomyces complex determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 3: 417–432.
- Lakkawar, A.W., Narayanaswamy, H.D., Satyanarayana, M.L. (2017). Study on efficacy of diatomaceous earth to ameliorate aflatoxin-induced pathomorphological changes in lymphoid organs of broiler chicken. *Veterinaria* 66–3.
- Magnoli, A.P., Monge, M.P., Miazzo, R.D., Cavaglieri, L.R., Magnoli, C.E., Merkis, C.I., Cristofolini, A.L., Dalcero, A.M., Chiacchiera, S.M. (2011). Effect of low levels of aflatoxin B1 on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. *Poult. Sci.* 90: 48–58.
- Magnoli, A.P., Texeira, M., Rosa, C.A.R., Miazzo, R.D., Cavaglieri, L.R., Magnoli, C.E. (2011). Sodium bentonite and monensin under chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 90: 352–357.
- Magnoli, A.P., Rodriguez, M.C., Poloni, V.L., Rojo, M.C., Combina, M., Chiacchiera, S.M., Dalcero, A.M., Cavaglieri, L.R. (2016). Novel yeast isolated from broilers' feedstuff, gut and faeces as aflatoxin B1 adsorbents. *J. Appl. Microbiol.* 121: 1766–1776.
- Magnoli, A.P., Rodriguez, M.C., Poloni, V.L., Peralta, M.F., Nilson, A.J., Miazzo, R.D., Chiacchiera, S.M., Dalcero, A.M., Cavaglieri, L.R. (2017). Use of yeast

(*Pichia kudriavzevii*) as a novel feed additive to ameliorate the effects of aflatoxin B1 on broiler chicken performance. *Mycotoxin Research* 33: 273–283.

Magnoli, A.P., Poloni, V.L., Peralta, M.F., González Pereyra, M.L., Pereyra, C., Nilson, A.J., Miazzo, R.D., Chiacchiera, S.M., Cavaglieri, L. (2018). Evaluación del comportamiento productivo de pollos parrilleros alimentados con levadura (*Pichia kudriavzevii*) sola y en combinación con aflatoxina B1 y monensina. *Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus* 1: 47–55.

Magnoli, A.P., Poloni, V.L., Cavaglieri, L. (2019). Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. *Current Opinion in Food Science*. 29: 99–108.

Markiewicz, W., Barski, Da., Burmańczuk, A., Ewa, T. (2014). Toxicity of salinomycin and narasin in turkeys. *J. Elem.* 19: 903–914.

Martínez, M.P., González Pereyra, M.L., Pena, G.A., Poloni, V.L., Fernandez Juri, M.G., Cavaglieri, L. (2017). *Pediococcus acidolactici* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from rainbow trout ecosystem have probiotic and ABF1 adsorbing/degrading abilities in vitro. *Food Additives and Contaminants* 11: 1–3.

Mehdi, Y., Letourneau-Montminy, M.P., Gaucher, M.L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Kaur, B.S., Cote, C., Avalos, R.A., Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition* 4: 17078.

Peng, X., Bai, S., Ding, X., Zeng, Q., Zhang, K., Fang, J. (2015). Pathological changes in the immune organs of broiler chickens fed on corn naturally contaminated with aflatoxins B1 and B2. *Avian Pathology*, 44:3, 192-199.

Poloni, V.L., Magnoli, A.P., Fochesato, A., Cristofolini, A., Caverzan, M., Merkis, C., Montenegro, M., Cavaglieri, L. (2020). A *Saccharomyces cerevisiae* RC016-based feed additive reduces liver toxicity, residual aflatoxin B1 levels and positively influences intestinal morphology in broiler chickens fed chronic aflatoxin B1-contaminated diets. *Animal Nutrition* 6: 31–38.

Roto, S.M., Rubinelli, P.M., Ricke, S.C. (2015). An introduction to the avian gut microbiota and the ef-

fects of yeast based prebiotic-type compounds as potential feed additives. *Frontiers in Vet Sci* 2:2–28.

Sarang, N.R., Babu, L.K., Kumar, A., Pradhan, C.R., Pati, P.K., Mishra, J.P. (2016). Effect of dietary supplementation of prebiotic, probiotic, and synbiotic on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Vet World*. 9(3):313-319.

Solano, W., Giambone, J., Williams, I. (1986). Effect of Maternal Antibody on Timing of initial Vaccination of chicks, against Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.*30: 648–652.

Yiannikouris, A., André, G., Poughon, L., Francois, J., Dussap, C., Jeminet, G., Bertin, G., Jouany, J.P. (2006). Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with Beta-D-Glucans. *Biomacromolecules* 7:1147-1155.