

Micotoxinas y Fosfatasa Alcalina de Camarón Cultivado

Josafat-Marina Ezquerria-Brauer (1); Jesús-Alberto Pérez-Acosta (2);
Armando Burgos-Hernández (1); Enrique Márquez-Ríos (1); Aldo-Alejandro
Arvizu-Flores (3)

(1) Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Blvd.
Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, 83000. Apdo. Postal 1658.

(2) Hermosillo, Sonora, México.

(3) Estudiante de la Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. División de Ciencias
Biológicas y de la Salud. Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col.
Centro, 83000. Hermosillo, Sonora, México.

(4) Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas
y Rosales s/n, Col. Centro, 83000. Hermosillo, Sonora, México.

Email: ezquerria@guayacan.uson.mx

Resumen

En varios insumos empleados para la elaboración de dietas para camarones, se han detectado la presencia de hongos productores de toxinas, entre los que destacan *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Dependiendo de la concentración de la micotoxina es el daño observado, sin embargo, el principal problema es que, difícilmente en la naturaleza se encuentra una sola toxina, por lo que el riesgo se potencializa, por un efecto sinérgico cuando hay más de dos toxinas presentes. En *Litopenaeus vannamei* se detectó que la aflatoxina afecta la actividad de varias enzimas, entre ellas la fosfatasa alcalina (FAL). La FAL es una enzima hidrolasa relacionada con sistemas de eliminación de toxinas. En la FAL semipurificada del hepatopáncreas de *L. vannamei*, se observó que tanto la AFB₁ como la FB₁, solas o en mezcla, tuvieron la capacidad de potenciar la actividad de la enzima. El mayor efecto se obtuvo al tener mayor concentración de AFB₁ en la mezcla. La temperatura también influyó sobre la actividad de la FAL, hasta los 35°C y AFB₁ la actividad aumenta, mientras que a 45°C aún en presencia de micotoxinas dicha actividad disminuye drásticamente. La concentración media efectiva (EC₅₀) establecida para AFB₁ fue de 205 ng/g y para FB₁ 1.8 µg/g.

Abstract

The presence of mycotoxins in shrimp feed has been detected. Most of the mycotoxins that have the potential to reduce growth and health status of shrimp and other farmed animals consuming contaminated feed are produced by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium sp.* The effect of the mycotoxin depends of its concentration. Since toxins are often present in combination in a single ingredient or a final diet, toxic effects due to synergistic action are common. The effect of AFB₁, FB₁ and, combination of AFB₁:FB₁ toxicity to *Litopenaeus vannamei* results in the modification of semi-purified alkaline phosphatase (AP) activity. AP is a hepatopancreatic enzyme that functions in detoxification. AP activity was mainly affected by AFB₁. Highest AP activity was detected at 35°C with high AFB₁ level. AP activity decreased at 45°C even with the presence of mycotoxins. The half maximal effective concentration (EC₅₀) for AFB₁ was 205 ng/g and 1.8 µg/g for FB₁.

Palabras clave: Micotoxinas, mezcla, fosfatasa alcalina, camarón cultivado

Introducción

En la actualidad durante la elaboración de alimentos para organismos acuáticos existe una fuerte tendencia a disminuir el uso de harina de pescado, por lo que se ha aumentado la inclusión de insumos de productos de origen vegetal, los cuales pueden venir contaminados con hongos o bien favorecer el desarrollo de estos, y a su vez repercutir en el organismo (Srping & Fegan, 2005). Sin embargo, aún se considera el desarrollo o la presencia de mohos u hongos en los alimentos como un problema de apariencia y molestia pasajera, sin analizar del todo las consecuencias que pueden acarrear la presencia de éstos productos en organismos cultivados.

Se sabe que existen más de 200 especies de hongos toxigénicos que bajo condiciones especiales son capaces de producir las toxinas conocidas como micotoxinas (WHO, 1990). Las micotoxinas, por lo tanto son: subproductos tóxicos o metabolitos secundarios de algunos hongos que pueden desarrollarse en ciertos productos alimenticios antes de la cosecha o después de ella, durante el transporte o almacenamiento en condiciones idóneas; compuestos carcinogénicos que fueron descubiertos en hongos que se desarrollan principalmente en maíz, estos hongos son *Fusarium verticilloides* y *Fusarium proliferatum* (Keller, Turner & Bennett, 2005). Además, se consideran de gran importancia para la salud animal ya que pueden reducir el crecimiento y afectar adversamente el metabolismo de las especies de cultivo. En general, el estado patológico que se desencadena por el consumo de alimentos contaminados con micotoxinas se conoce como micotoxicosis (Keller *et al.*, 2005).

El desarrollo de los hongos se ve favorecido cuando hay alta humedad y temperatura de templada a cálida, por lo que en lugares tropicales y sub-tropicales es común la presencia de éstos. Y debido a que las condiciones de crecimiento y desarrollo de los hongos varía grandemente entre el campo y el almacenamiento, diferentes tipos de hongos pueden estar presentes en los alimentos, produciendo así un coctel de micotoxinas. Aunque miles de

micotoxinas son las que se han identificado, las de mayor ocurrencia y tóxicas son la aflatoxina, ocratoxina A, tricotecenes (T2), zeralanona, fumonisina y monoliformina (CAST, 1989).

De los hongos comúnmente encontrados en climas tropicales o semi-tropicales está el *Aspergillus flavus*, que produce la aflatoxina, que es una hepatoxina carcinogénica. Durante el almacenamiento los principales hongos que se desarrollan son especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, y producen la ocratoxina A, otra toxina carcinogénica. En lugares de climas más templados, el hongo *Fusarium* es muy común, el cual se desarrolla en la tierra y la micotoxina de *Fusarium* es considerada de las más comunes a nivel global (CAST, 1989).

En varias granjas camaronícolas en el Estado de Sonora se detectó que el alimento para camarón presentaba el desarrollo de varios hongos toxigénicos, entre los que destacaban *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, exponiendo de esta forma al camarón cultivado al posible efecto dañino de estos contaminantes (Burgos-Hernández, Farías, Torres-Arreola & Ezquerro-Brauer, 2005). Dependiendo de la concentración de la micotoxina, es el daño observado en los camarones. Sin embargo el principal problema es que difícilmente se encontrará solamente una de estas toxinas en los insumos, por lo que el riesgo se potencializa, ya que se sabe que hay un efecto sinergista cuando hay dos o más toxinas presentes (Spring *et al.*, 2005).

En diversos trabajos realizados en *L. vannamei* y *Penaeus monodon*, donde los organismos fueron alimentados con dietas conteniendo aflatoxina B₁ (AFB₁) se detectó que uno de los principales tejidos afectados fue perteneciente al hepatopáncreas, notándose anormalidades y necropsia en dicho tejido (Boonyaratpalin, Supamattaya, Verakunpiriya & Supraser, 2001). Aunque aparentemente la intoxicación de seres humanos con AFB₁ por el consumo de camarones que hayan sido alimentados con AFB₁ es muy baja (Bintvihok, Ponpornpisit, Tangtrongpiros, Panichkriangkrai, Rattanapanee, Doi & Kamagai, 2003; Divakaran &

Tacon, 2000), la presencia de micotoxinas puede causar pérdidas económicas a los productores.

Estudios *in vitro* realizados por Burgos-Hernández *et al.* (2005) demostraron que las micotoxinas FB₁ y AFB₁ afectaban la actividad de las enzimas tripsina y colagenasa extraídas del hepatopáncreas del camarón blanco (*L. vannamei*). Mientras que en otros estudios *in vivo* se detectó que la presencia de AFB₁ en alimentos para camarón (*P. monodon*), afectaba a la enzima fosfatasa alcalina aumentando su actividad (Boonyaratpalin *et al.*, 2001).

La fosfatasa alcalina (E.C. 3.1.3.1) es una enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos de fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. Actúan en la digestión de los alimentos, previamente a otras fases de su degradación. Como sugiere su nombre, las fosfatasas alcalinas son más efectivas en un entorno alcalino (Cohen, 1989). Esta enzima ha sido caracterizada en varias especies de camarón como *Pandalus borealis* (Olsen, Øverbo & Myrnes, 1991) y *Penaeus japonicus* (Chaung & Shih, 1990), observándose que el peso molecular de la enzima variaba según la especie estudiada entre 40 a 65 kDa. En el camarón, la fosfatasa alcalina se ha identificado como una enzima hepatopancreática que actúa durante los procesos de detoxificación. Cuando el hepatopáncreas trabaja para eliminar toxinas, se propicia una mayor actividad de la fosfatasa alcalina en este órgano.

Estudios del efecto de las micotoxinas en la Fosfatasa Alcalina (FAL) de camarón cultivado

Las micotoxinas en general inducen diversos síntomas adversos en los animales. Uno de los síntomas que más se ha reportado es el decremento en el sistema humoral en los organismos, detectándose supresión de la fagocitosis, disminución en la producción de anticuerpos y retraso en la hipersensibilidad. En cuanto a la acción específica de las aflatoxinas, éstas se ha visto que obstruyen las síntesis del mRNA, así como del DNA, lo cual afecta la síntesis de proteínas y esto propicia un desarrollo anormal en el procesamiento de lípidos (Limpoka, 1980). Mientras que las fumonisinas pueden afectar el

Ezquerro-Brauer, J. *et al.* 2011. Micotoxinas y Fosfatasa Alcalina de Camarón Cultivado. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 105-116.

metabolismo de esfingolípidos mediante la modificación de los caminos metabólicos, esto induce un crecimiento anormal a nivel celular y apoptosis (Carlson *et al.*, 2001).

Por otro lado, cuando en el camarón se ha detectado que hay baja síntesis de proteínas en el plasma y un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina, así como de transaminasas, es un indicio de que el organismo está siendo afectado por algún agente extraño (Limpoka, 1980).

El estudio sobre el efecto de las micotoxinas y la FAL en camarón en cultivo es escasa, Boonyaratpalin *et al.* (2001) detectaron que después de exponer al camarón *P. monodon* por 6 semanas a diferentes niveles de aflatoxina B₁ hubo una correlación positiva entre la concentración de AFB₁ y la actividad de la FAL ($r=0.89$). Hose, Lightner, Redman & Danald (1984) detectaron que al exponer al camarón *P. californiensis* a *Fusarium solani*, la actividad de la FAL entre otras enzimas evaluadas, presentes en la hemolinfa, aumentaba su actividad hasta 43 U/L a medida que avanzaba la infección por *F. solani*. Mientras que Supamattaya, Sukrakanchana, Boonyaratpalin, Schatzmayr & Chittiwon (2005) observaron un decremento en la cantidad de FAL en el suero de *P. monodon* ante la presencia de Ocratoxina A y Deoxynivalenol.

Recientemente en un estudio *in vitro* llevado con camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), se semipurificó la enzima FAL del hepatopáncreas del organismo y se determinó el efecto de diferentes concentraciones AFB₁ y FB₁ sobre la actividad de la enzima semipurificada.

Estudio *in vitro* del efecto de la fumonisina B₁ y aflatoxina B₁ en la actividad de la Fosfatasa Alcalina (FAL) del hepatopáncreas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)

En este trabajo se semipurificó la FAL, del hepatopáncreas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Se semipurificó esta enzima mediante una extracción con butanol y acetona. Durante estas dos etapas se le dio seguimiento a la actividad usando como sustrato

el *p*-nitrofenilo. Una vez obtenida la enzima se evaluó el efecto que la AFB₁, FB₁, así como la acción combinada de ambas micotoxinas sobre la actividad de la misma. Así también, se estableció la respuesta de la FAL en presencia o ausencia de las micotoxinas a diferentes temperaturas de incubación.

La FAL se incubó con AFB₁ en concentraciones de 10-10,000 ng/g, y con FB₁ de 0.5-2.0 µg/g, seleccionándose la concentración de ambas micotoxinas con mayor efecto, realizándose mezclas de AFB₁ y FB₁ en proporciones 3000 ng/mL AFB₁:1.4 µg/mL FB₁, 2000 ng/mL AFB₁:1.6 µg/mL FB₁ y 1000 ng/mL AFB₁:1.8 µg/mL FB₁. Finalmente se determinó el efecto de la temperatura (15, 25, 35 y 45°C) sobre la actividad de la enzima previamente incubada con las micotoxinas y con la mezcla AFB₁: FB₁.

En los extractos crudos (butanólico), como el acetónico se presentaron actividad tipo FAL. La actividad del extracto acetónico fue de 0.12 U/mg de proteína y el del butanólico 0.06 U/mg de proteína, lo cual indicó que la enzima se semipurificó solo 2 veces.

La fracción butanólica fue posteriormente analizada por electroforesis en SDS-PAGE, donde se detectó una banda que presento actividad ante caseína, cuyo peso molecular estimado fue de 55.48 kDa, valor muy similar al reportado en la literatura (Figura 1). La temperatura óptima de acción de la enzima semipurificada fue de 35°C (Figura 2).

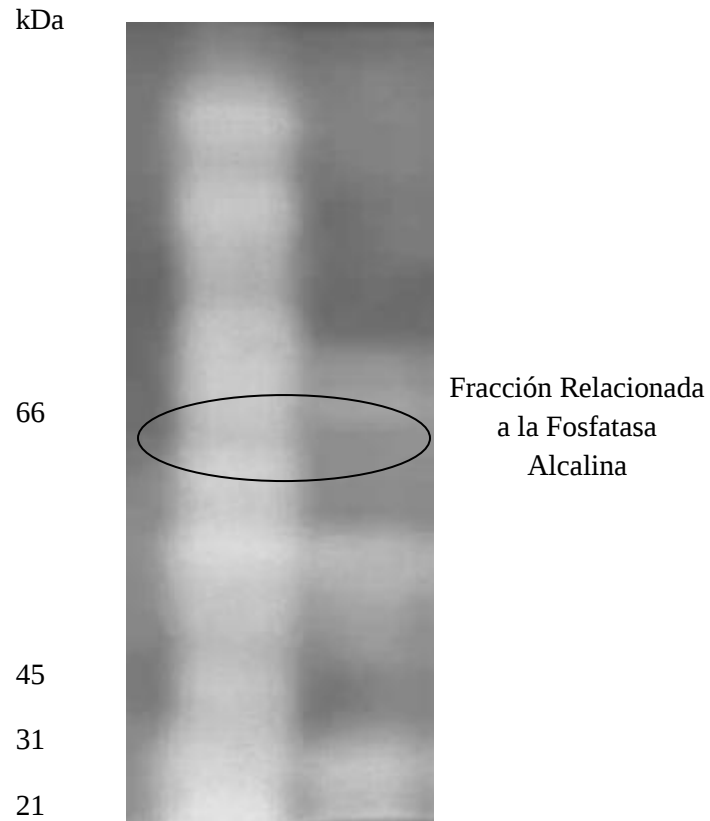


Figura 1. Zimograma de actividad de la fosfatasa alcalina semi purificada del hepatopáncreas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado.

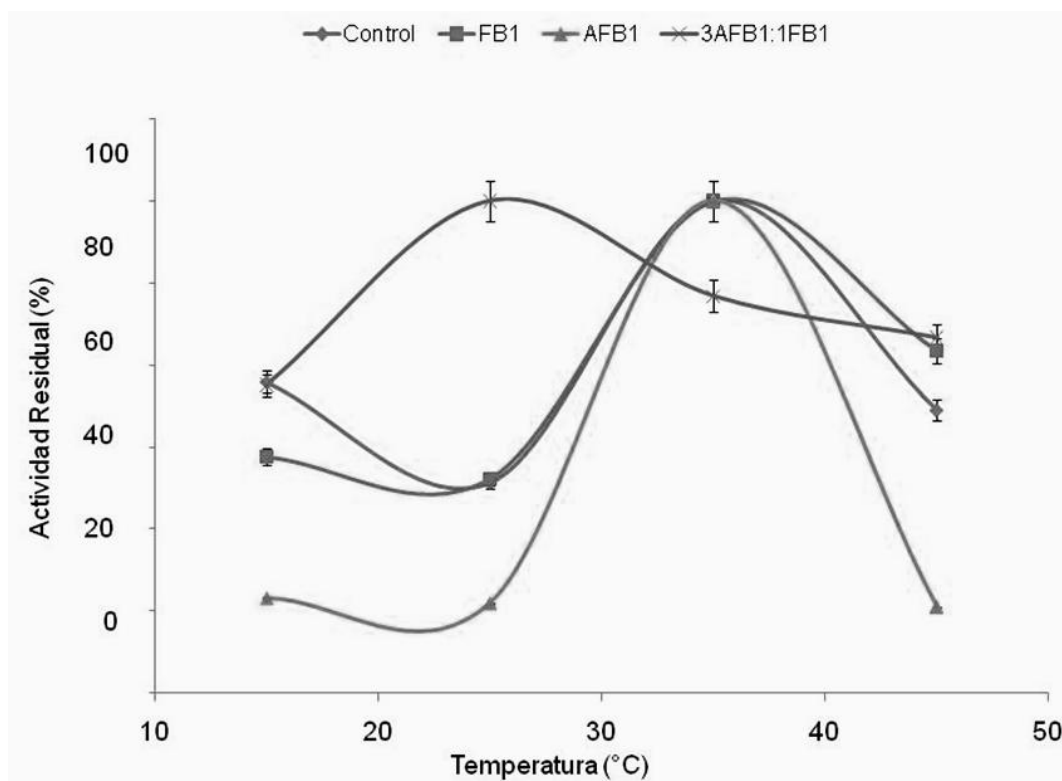


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la FAL en presencia de la aflatoxina B₁ y fumonisina B₁. En el eje X se muestran las temperaturas en un modo creciente en las que se realizaron ensayos a 15°C, 25°C, 35°C, y 45°C y en el eje Y se muestra la actividad residual de fosfatasa alcalina ajustada en porcentaje. Con un control, 10 000 ng/g AFB₁, 2 µg/g FB₁, y una mezcla 3000 ng/g AFB₁: 1.4 µg/g FB₁.

Se detectó un aumento de la actividad de 10 U/mg proteína a 1.51 U/mg proteína a mayor concentración de AFB₁ (10 000 ng/g). Al tomar esta concentración y observar su comportamiento a varias temperaturas se vio un incremento muy notorio en la actividad a 35°C (Figura 2), mientras que a 45°C se detectó la menor actividad. Mediante la curva de dosis respuesta y la aplicación del algoritmo matemático se estableció que la concentración media efectiva (EC₅₀) para la AFB₁ fue de 205 ng/g. Lo cual está indicando que cuando los camarones sean alimentados con dietas conteniendo 205 ng/g la enzima se activará en un 50% como un mecanismo de defensa ante la presencia de esta micotoxina, tal como se ha observado en los estudios *in vivo* reportados por otros autores (Boonyaratplin *et al.*, 2001).

Cuando se evaluó el efecto de la FB₁ en la actividad de la fosfatasa alcalina, se apreció que la actividad se incrementó de 0.10 U/mg proteína a 0.27 U/mg proteína cuando se incubó con la máxima concentración (2.0 µg/g). Al igual que con la AFB₁, también se obtuvo la EC₅₀ para FB₁, mediante una curva dosis-respuesta y la aplicación del algoritmo matemático, la cual se estableció en 1.8 µg/g.

En el efecto conjunto se observó que al incubar la enzima con la mezcla AFB₁:FB₁ en relación (3000 ng/mL AFB₁:1.4 µg/mL FB₁, 2000 ng/mL AFB₁:1.6 µg/mL FB₁) la actividad fue potenciada, de 0.10 U/mg proteína a 0.19 U/mg proteína, detectándose que a mayor concentración de AFB₁ en la mezcla mayor fue la activación de la enzima. En cuanto al efecto conjunto de la mezcla de micotoxinas 3000 ng/g AFB₁:1.4 µg/g FB₁ y temperatura, se observó que esta mezcla afectó la temperatura óptima de acción de la enzima, ya que la máxima actividad se detectó a los 25°C (p<0.05) en presencia de la mezcla al compararse con los otros tratamientos.

La fosfatasa alcalina utiliza como sustrato grupos fosfatos y las micotoxinas no poseen dentro de su estructura grupos fosfatos, esto hace suponer que esta enzima se activa indirectamente ante la presencia de esas toxinas y así ayuda a la expulsión de estos agentes tóxicos, al igual que sucedería con cualquier otro agente extraño que se aloje en el hepatopáncreas del camarón. Lo que implicaría un desgaste energético para el organismo, y esto propiciar problemas con el desarrollo del camarón. Como se ha observado en varios trabajos donde, ante la presencia de micotoxinas hubo pérdida de peso, además dependiendo de la concentración de la micotoxina evaluada, mortalidad en los organismos (García-Morales, Pérez-Velásquez, Burgos-Hernández, Cortez-Rocha, Ezquerro-Brauer, 2008; Supamattaya *et al.*, 2005; Bintvihok *et al.*, 2003; Boonyaratpalin *et al.*, 200; Ostrowski-Meissner, LeaMaster, Duerr & Walsh, 1995).

Referencias

- Bintvihok A., Ponpornpisit, A., Tangtrongpiros, J., Panichkriangkrai, W., Rattanapanee, R., Doi K. & Kamagai S. (2003). Aflatoxin contamination in shrimp feed and effects of aflatoxin addition to feed on shrimp production. *Journal of Food Protection* 66, 882–885.
- Boonyaratpalin M., Supamattaya K., Verakunpiriya V. & Supraser D. 2001. Effects of aflatoxins B1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimps (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture Research* 32, 388-398.
- Burgos-Hernández A., Farias S. I., Torres-Arreola W., & Ezquerro-Brauer J. M. (2005) In vitro studies of the effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on trypsin-like and collagenase-like activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 250, 399–410.
- CAST (1989) Mycotoxins: Economic and Health Risks In: *Council for Agriculture Science and Technology Task Force*. Report 116. Ames, IA.
- Chaung N.N & Shih SL (1990) Purification and some properties of alkaline phosphatase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Experimental Zoology* 256, 1-7.
- Cohen P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Ann. Rev. Biochemistry* 58, 453-508.
- Divakaran S. & Tacon A. (2000) Studies on the toxicity of shrimp (*Penaeus vannamei*) fed diets dosed with aflatoxin B1 to humans. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 9, 11 5-119.
- García-Morales MH, Pérez-Velásquez M, Burgos-Hernández A, Cortez-Rocha MO, Ezquerro-Brauer JM. (2008) Effects of fumonisin B1 on growth, survival, and ice storage life of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *59th Pacific Fisheries Technologists Annual Meeting* pp.49. San Francisco, Cal. USA.
- Hose J.E., Lightner D.V., Redman R.M. & Danald D.A. (1984) Observations on the pathogenesis of the imperfect fungus, *Fusarium solani*, in the California brown shrimp, *Penaeus californiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 44, 292-303.
- Keller NP, Turner G, & Bennett JW (2005). Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3, 937–947.
- Olsen R.L., Øverbø K. & Myrnes B. (1991) Alkaline phosphatase from the hepatopancreas of shrimp (*Pandalus borealis*): A dimeric enzyme with catalytically active subunits. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 99, 755-761.
- Ostrowski-Meissner H., LeaMaster B., Duerr E. & Walsh W. (1995) Sensitivity of the pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, to aflatoxin B1. *Aquaculture* 131,155-164.

- Spring P. & Fegan D.F. (2005) Mycotoxins- a rising threat to aquaculture. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium, Lexington, Kentucky, USA.
- Supamattaya K., Sukrakanchana N., Boonyaratpalin M., Schatzmayr D.& Chittiwan V. (2005) Effects of ochratoxin A and deoxynivalenol on growth performance and immuno-physiological parameters in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 27(Suppl. 1), 91-99
- WHO (1990) Environmental Health Criteria for Selected Mycotoxins: Ochratoxins, and Trichothecenes, Ergot. In: World Health Organization. Geneva.