

NUEVAS TENDENCIAS EN LA ALIMENTACIÓN DE CONEJOS: INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN SOBRE LA SALUD INTESTINAL

Rosa Carabaño, Pilar G. Rebollar, M^a Soledad Gómez-Conde, Susana Chamorro,
Javier García y Carlos de Blas
Departamento de Producción Animal. Universidad Politécnica de Madrid

1.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades infecciosas del sistema digestivo representan el 71% del total de las enfermedades que afectan al conejo. Este porcentaje, siempre alto, se ha incrementado en los últimos años como resultado de la aparición de la Enteropatía Epizoótica del Conejo (EEC). Esta enfermedad puede llegar a causar hasta un 60% de mortalidad y un aumento de la morbilidad, que causa retrasos en la finalización del cebo entre una y dos semanas. La utilización de antibióticos ha sido la manera más habitual de controlar la mortalidad debida a esta enfermedad y esto ha hecho que el coste de tratamientos veterinarios se haya multiplicado por 2,5 reduciéndose el margen de beneficio de las explotaciones. Junto con la EEC siguen existiendo otras enfermedades digestivas producidas mayoritariamente por distintas cepas de E. coli.

La prohibición europea del uso de antimicrobianos para la prevención de enfermedades digestivas y la poca diversidad de moléculas permitidas en cunicultura para su tratamiento ha hecho imprescindible la búsqueda de soluciones alternativas para tratar de reducir su incidencia.

Entre las alternativas que se han planteado, el manejo de la nutrición es prioritario dada la elevada importancia que se le concede en la incidencia de cualquier proceso entérico. Sin embargo, analizando los datos de los experimentos de nutrición es frecuente observar que animales alimentados con el mismo pienso pueden mostrar mortalidades causadas por EEC desde el 0 hasta el 70% dependiendo del periodo del año, granja, etc., y

por supuesto en función de que se medique o no. Esto pone de manifiesto que la alimentación no parece ser el factor determinante de la aparición de los procesos entéricos y que son necesarios la coexistencia de otros factores que desencadenen el proceso.

El principal factor responsable de las enfermedades entéricas es la presencia del patógeno. Sin embargo, aun en su presencia, factores como la microbiota saprofita que está presente en el tracto digestivo y los mecanismos de defensa que tiene el animal pueden impedir o reducir el crecimiento del patógeno y el desarrollo de los procesos de patogenicidad. Esto explica por qué en experimentos donde se provoca infecciones controladas, con cepas muy virulentas, no todos los animales mueren, observándose un porcentaje de animales que, presentando síntomas de la enfermedad, son capaces de sobrevivir (morbilidad).

Estos mecanismos de defensa no son exclusivos del conejo y, de hecho, el papel que puede jugar la alimentación se ha centrado, como en otras especies (cerdos y aves) e incluso en alimentación humana, en desarrollar estrategias que favorezcan lo que se ha denominado “exclusión competitiva” entre bacterias y el desarrollo de los mecanismos de “barrera intestinal”.

Los mecanismos por los que una especie no patógena predomine sobre otra patógena (exclusión competitiva) son complejos. De acuerdo con Hampson et al. (2001), hay diversas rutas por las que se puede producir esta competencia:

- diferencias de crecimiento a partir de un substrato específico.
- diferencias en la eficacia de colonización de la mucosa.
- producción de sustancias inhibitorias del desarrollo de patógenos (ácidos grasos de cadena corta, sulfídrico, sales biliares deconjugadas y bacteriocinas).

El papel que puede jugar la nutrición en este campo se centraría en regular la cantidad de substrato que favoreciese el crecimiento de una microbiota que favorezca cualquier mecanismo de exclusión competitiva o que inhiba directamente el crecimiento de patógenos. Para ello es necesario:

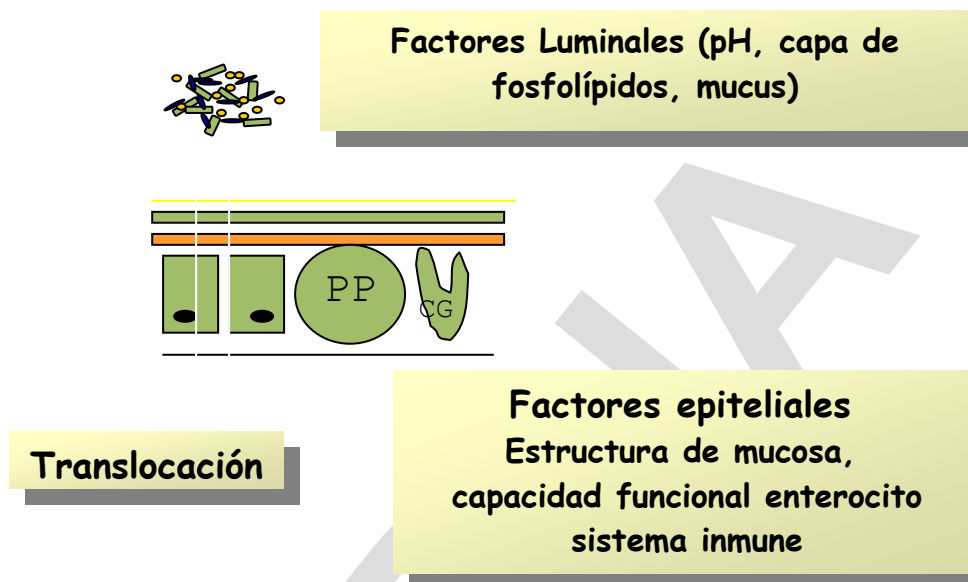
- a) Conocer el flujo de nutrientes en las áreas de mayor población microbiana (final de intestino delgado y ciego)
- b) Caracterizar la microbiota saprofita o beneficiosa y la patógena
- c) Caracterizar los mecanismos de exclusión competitiva entre poblaciones patógenas y no patógenas

Una vez implantado el patógeno, la “barrera intestinal” juega un papel fundamental en el desarrollo de los mecanismos de patogenicidad de las bacterias, impidiendo la

colonización de la mucosa y la translocación de bacterias y toxinas a través de ella. Los mecanismos por los que se ejerce esta acción son múltiples y se desarrollan en cascada de tal manera que se van poniendo en funcionamiento a medida que se van traspasando.

Figura 1.- Mecanismos de barrera intestinal que impiden la translocación.

(PP placas de Peyer, C G: Células Globex)



Como se observa en la figura 1, el efecto barrera se ejerce ya desde el lumen intestinal por medio de mecanismos de acidificación y protección del epitelio por una capa de mucus secretada por las Células Globex. Este mucus protege al epitelio de daños mecánicos, químicos o enzimáticos y de la adhesión de bacterias. Una vez que esta protección se pierde y las bacterias y toxinas se ponen en contacto con la mucosa, el sistema inmune ligado a la mucosa se pone en funcionamiento, primero de manera inespecífica y posteriormente desarrollando mecanismos de tolerancia. Además se ha comprobado que el mantenimiento de la estructura y de la funcionalidad de la mucosa intestinal impide la colonización de bacterias patógenas y asegura funciones del tracto digestivo, tales como la digestión, absorción, secreción y el metabolismo de los nutrientes. Esto explica por qué las enfermedades entéricas son más frecuentes en animales jóvenes (mucosa inmadura) y en el periodo postdeste, ya que éste puede producir daños estructurales a nivel de la mucosa intestinal.

Las estrategias a desarrollar desde el punto de vista de la nutrición han ido encaminadas a evitar daños en la estructura de la mucosa y a favorecer los mecanismos de reparación de estos daños suministrando los nutrientes necesarios. Unas características de barrera de la mucosa adecuadas, no sólo mejoran la respuesta inmune, sino también su eficacia digestiva y absorbente, disminuyendo los flujos de nutrientes al ciego que pueden favorecer el crecimiento de patógenos.

Estas estrategias no son fáciles de desarrollar ya que existen numerosas interacciones entre todos los factores implicados pero, a medida que se avanza en el conocimiento, se observa que son una vía útil para controlar las enfermedades digestivas.

El objetivo de este trabajo no es hacer una exposición exhaustiva del papel de la nutrición sobre todo el conocimiento en estas áreas (más desarrolladas en humana y otros monogástricos), sino exponer los resultados obtenidos en conejos y sobre todo su incidencia en la barrera intestinal y el desarrollo de la enteropatía mucoide.

2.- LA MUCOSA INTESTINAL Y LA MICROBIOTA INTESTINAL

La interacción de la mucosa con la microbiota intestinal parece clave tanto para el desarrollo de los mecanismos de defensa como de los de patogenicidad (colonización y translocación de bacterias y toxinas). Los principales patógenos del tracto gastrointestinal necesitan el contacto con la mucosa para ejercer su patogenicidad. Son numerosos los estudios que demuestran la necesidad de la adherencia a la mucosa de las cepas virulentas de *E. coli* para ejercer su efecto patógeno. Otras bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal del conejo son las pertenecientes al género *Clostridium*, éstas no suelen ser adherentes sino que su virulencia se expresa mediante la formación de toxinas (*C. spirioforme*, *perfringens*, *difficile*, *sporogenes*, etc). La muerte del animal por Enteropatía Epizoótica del conejo, la produce una toxina (aun sin clasificar) de una cepa de *Clostridium perfringens* que produce daños a nivel de hígado y riñón (Pérez de Rozas et al., 2005). Sin embargo, para que estas toxinas lleguen a los órganos receptores y ejerzan su función tóxica han de traspasar la mucosa. La adhesión de las toxinas de *Clostridium perfringens* a la membrana, así como un daño inicial de ésta parece que son necesarios para que se produzca la translocación (Mc Clane, 2001).

Del mismo modo, las bacterias saprofitas, que ejercen una función de exclusión competitiva en humana y otros monogástricos (*Bacteroides*, *Lactobacilos*, *Salmonelas* saprofitas), parecen poseer mecanismos de aproximación a la mucosa y reconocimiento de ésta (Toll-like receptors, TLR) que permiten modular la respuesta inmune hacia su tolerancia en el tracto gastrointestinal (Kelly et al., 2005).

2.1.- La capa de mucus

Para que se produzca el contacto con la mucosa es necesario vencer las primeras barreras intestinales que se encuentran en el lumen. Como se mencionó anteriormente, el epitelio de la mucosa se encuentra protegido por una capa de mucus. Las mucinas son gliconjugados que se componen de un corazón de proteína unido a cadenas de azúcares de longitud variable. Las cadenas terminales de estos azúcares pueden estar sulfatadas o

sialilatadas, dando lugar a mucinas ácidas que son más resistentes a la degradación por los microorganismos que las neutras, que no poseen estas terminaciones (Van Dijk et al., 2002). Mantle y Thakore (1988) purificaron separadamente las mucinas de intestino delgado y de colon del conejo, encontrando que las mucinas del colon son menos ácidas y menos resistentes a la proteólisis. La cantidad y composición de estas mucinas está relacionada con la presencia de bacterias. Sin embargo, el equilibrio en la cantidad y calidad de éstas compatibles con una mejora en la salud intestinal está todavía en estudio. En los primeros momentos de una infección y como mecanismo de protección, se produce un aumento de la producción de mucus y un cambio en su composición pasando de mucinas neutras a ácidas. La infección controlada con *Yersinia enterocolica* en conejos produce un aumento de la producción de mucinas especialmente en la zona terminal del ileon y el colon proximal donde es más severa esta enfermedad intestinal (Mantle et al., 1989). Sin embargo, variaciones en la composición y degradación de estas mucinas pueden variar la adhesión de estas bacterias a la mucosa (Mantle y Husar, 1994). Del mismo modo, Hezcko et al. (2000) observaron un aumento de producción de mucus en los primeros momentos de la infección con *E. coli* O103, si bien parece que la capa de mucus es fundamental para que se produzca la proliferación y el desarrollo de los procesos de adhesión a la mucosa en momentos posteriores de la infección y, por lo tanto, para que se muestren sus efectos patógenos.

Las bacterias saprofitas también tienen capacidad de regular la síntesis, la composición y la utilización de las mucinas, pero sus mecanismos están peor estudiados que en el caso de las patógenas. *Bacteroides*, un género mayoritario en humana y conejos, parece que tiene capacidad mucinolítica (Hill, 1986, Marounek et al., 2000, Sirotek et al., 2003). En humana, *Bacteroides thetaiotaomicron* presenta también capacidad mucinolítica. Esta característica podría permitir un mejor contacto con la mucosa de las bacterias saprófitas y estar relacionado con el efecto inmunosupresivo de esta bacteria (Kelly et al., 2005). Pérez de Rozas et al. (2005) también señala que bacterias pertenecientes al género *Bacteroides* podrían actuar como probiótico en el caso de la EEC.

Además del mucus, en el lumen intestinal se forma una película biológica de IgA, producida por el sistema inmune de la mucosa, y de péptidos antimicrobianos producidos en las criptas por células específicas (Paneth cells) (Kelly et al., 2005). La IgA permite la supervivencia de bacterias saprofitas y limita el crecimiento de las patógenas. Por el contrario, los péptidos antimicrobianos limitan el crecimiento tanto de patógenos como de la población bacteriana saprofita. En humana, la densidad de las células productoras de estos péptidos desciende de los primeros tramos del aparato digestivo hasta el colon, lo que puede explicar la mayor densidad microbiana en ileon e intestino grueso. La exclusión competitiva que ejerce *Bacteroides thetaiotaomicron* podría estar relacionada con la inducción de un péptido específico contra bacterias patógenas.

2.2.- El sistema inmune ligado a la mucosa

Una vez rotas las barreras lumbinales, las bacterias se ponen en contacto con la mucosa intestinal por medio de receptores de membrana. Estos receptores son los que desencadenan la señal hacia el sistema inmune situado en la mucosa intestinal. El sistema inmune asociado a la mucosa (GALT) se encarga de la protección de la mucosa frente a patógenos y regula la respuesta inflamatoria. El sistema inmune intestinal es particularmente complicado ya que, no sólo se encarga de la defensa frente a agentes infecciosos, sino que también debe ser capaz de distinguir antígenos de la dieta y la flora saprofita del intestino y desarrollar un mecanismo efectivo de tolerancia frente a ellos para evitar situaciones de alergias a ciertos alimentos e inflamaciones. La respuesta de tolerancia es preferente frente a la de defensa y es la que asegura la supervivencia del animal.

El tejido linfoide del intestino se distribuye de dos formas distintas:

- De forma organizada: en folículos linfoides, distribuidos en las llamadas placas de Peyer, el apéndice vermiforme y saculus rotundus.
- De forma difusa: tanto en la lámina propia (linfocitos de la lámina propia) como entre las células epiteliales de la mucosa intestinal (linfocitos intraepiteliales).

El tejido linfoide organizado contiene numerosos folículos y son los centros donde se generan parte de las células del sistema inmune intestinal y se inicia su respuesta. Los antígenos se transportan a estos folículos por medio de unas células especializadas llamadas células M y son presentados a los linfocitos situados en los centros germinales de los folículos linfoides por las células M y por otras células especializadas llamadas células dendríticas. Tras la maduración y proliferación de los linfocitos especializados frente a un antígeno particular, estos migran principalmente hacia la mucosa intestinal (lámina propia y intraepitelio) para desarrollar su papel de defensa en siguientes contactos con los antígenos.

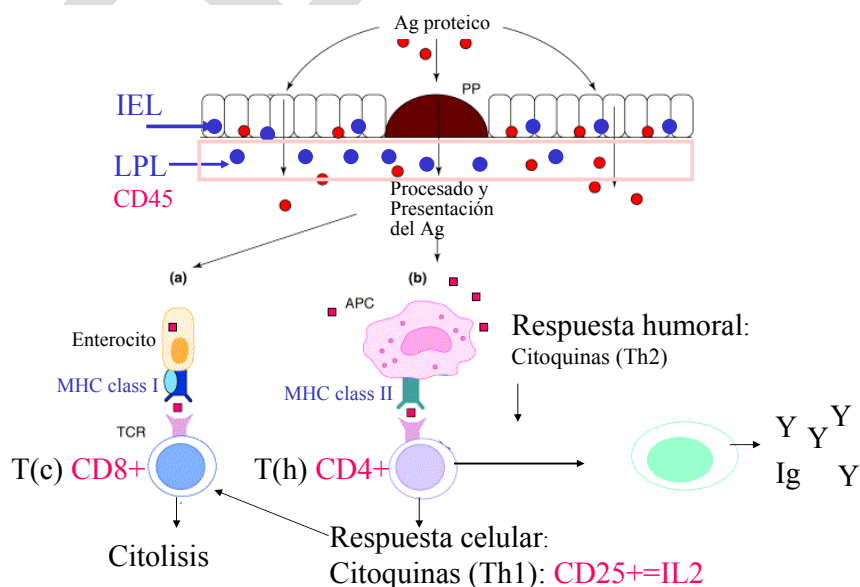
La lámina propia (LP) es el sitio de mayor producción de anticuerpos (inmunoglobulinas) de toda la mucosa. En humanos, alrededor del 80% de los linfocitos B (células encargadas de sintetizar las inmunoglobulinas) están presentes en la LP. La inmunoglobulina más importante sintetizada en el intestino es la IgA, siendo su principal misión la de mantener la integridad de la mucosa frente a posibles infecciones y agentes tóxicos. Otra inmunoglobulina importante a nivel intestinal es la IgE, que suele ser sintetizada en situaciones de reacciones alérgicas.

Los linfocitos intraepiteliales son la primera línea de defensa frente a infecciones de la mucosa y suelen tener actividad citotóxica y reguladora. Los linfocitos T citotóxicos

juegan un papel muy importante en la defensa frente a agentes virales y toxinas y en la recuperación tras las infecciones, que son muy comunes en la mucosa intestinal.

En la figura 2 se presenta un esquema de la respuesta inmune de la mucosa intestinal. Tras el reconocimiento de los antígenos, macrófagos y células dendríticas se encargan de procesar y presentar proteínas de estos antígenos a los linfocitos T cooperadores (Th) o CD4+. Los linfocitos Th se encargan de modular la respuesta secretando citoquinas (proteínas solubles) que activarán la respuesta humoral (complejo Th2) o una respuesta de tipo celular (complejo Th1). La respuesta humoral activa los linfocitos B que son los que van a secretar las Inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgG) contra antígenos específicos y llevarán a una respuesta de tolerancia. La respuesta celular está mediada por el complejo de citoquinas Th1 y da lugar a la activación (IL2: Interleukina 2) de los linfocitos T citotóxicos o CD8+ y la muerte de la célula que porta el antígeno. Además los linfocitos citotóxicos también pueden ser activados directamente a través de células de la mucosa (enterocitos) mediante el complejo de inmuno-histo-compatibilidad de clase I (MHCI). Esta respuesta es posible cuando se producen daños o agresiones en la mucosa y se facilita la penetración de bacterias, virus o toxinas. El equilibrio entre las respuestas de tolerancia (Th2) y agresivas (Th1) del sistema inmune no están completamente estudiadas, pero parece que las bacterias saprofitas, en especial algunos géneros, podrían mediar hacia la activación de las vías Th2 (Kelly et al., 2005).

Figura 2.- Esquema de la respuesta inmune ligada a mucosa. IEL: linfocitos intraepiteliales, LPL: linfocitos de la lámina propia, MHC class I y II: Complejos de inmuno-histocompatibilidad de clase I y II, T(c): linfocitos citotóxicos o CD8, T(h): linfocitos cooperadores o CD4, Ig: Inmunoglobulinas, IL 2 : Interleukina 2.



2.3.- El desarrollo del sistema inmune

Según Knight y Crane (1994), el desarrollo del sistema inmune del conejo, y en particular de las células B, se puede dividir en tres etapas. La primera etapa, fetal y neonatal, consiste en una linfopoyesis que creará el repertorio linfocitario neonatal y se lleva a cabo en el hígado y la médula principalmente. La segunda fase consiste en la creación de un repertorio primario de anticuerpos entre las semanas 3 y 8 de vida del animal por medio de la proliferación y diversificación de los linfocitos del GALT. La última etapa corresponde a la formación de un segundo repertorio de anticuerpos en la edad adulta del animal, que se trataría principalmente de la proliferación de células B en los órganos linfoides secundarios.

El repertorio que se crea en el feto depende de factores genéticos y la transmisión placentaria durante la gestación. Sin embargo, parece que el desarrollo del repertorio primario depende de la microbiota intestinal. Varios autores han encontrado un desarrollo anormal del GALT y una reducción en el número de linfocitos en animales criados libres de bacterias (Stepánkova y Kovaru, 1978; Tlaskalova y Stepánkova, 1980). Esta falta de desarrollo también se ha visto en cerdos. Rothkötter et al. (1994) observaron que animales de 45 días libres de patógenos mostraban un desarrollo del sistema inmune igual al de animales de 5 días, concluyendo que es necesario la presencia no sólo de los antígenos encontrados en el alimento, sino también de un estímulo de la flora bacteriana para un desarrollo normal del GALT. Distintas revisiones, tanto en conejos (Knight y Windstead, 1997, Lanning et al., 2000) como en humana (Kelly et al., 2005), indican que la presencia de la flora saprofita y, posiblemente de algunos géneros en especial, pueden ser cruciales para el desarrollo del repertorio primario.

La implantación de la flora en el conejo ocurre ya durante la etapa de lactancia, pero es a partir del inicio del consumo de pienso cuando se desarrolla el área fermentativa. De acuerdo con Lebas y Laplace (1972), el peso del contenido cecal (relativo al peso vivo del animal) se duplica entre la tercera y quinta semana de vida, manteniéndose esta importancia hasta la séptima semana. Coincidiendo con estos hechos, Dasso et al. (2000) observaron que el aumento del área folicular en el apéndice vermiforme se producía entre la tercera y la sexta semana de vida, manteniendo la misma importancia relativa hasta la edad adulta. También la zona proliferativa de los folículos se hace máxima a las 6 semanas de vida. Resultados similares se han obtenido en nuestro departamento para el apéndice vermiforme y las placas de Peyer.

El cambio en el desarrollo del sistema inmune en esta fase, no sólo afecta a los centros de proliferación de linfocitos, sino también al perfil que tienen éstos en la lámina propia y por lo tanto a la capacidad y diversidad de su respuesta.

Figura 3.- Evolución con la edad de la proporción de linfocitos sobre células totales en la lámina propia (LLP) del yeyuno en gazapos lactantes (Campín et al., 2003).

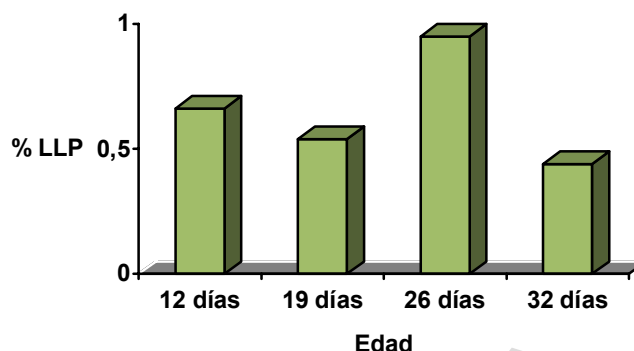
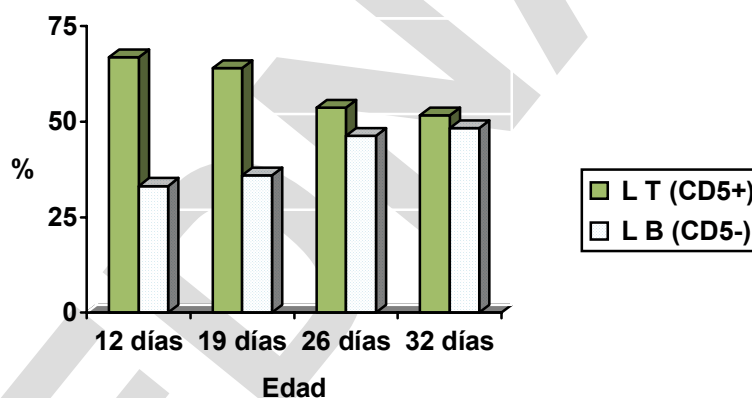


Figura 4.- Evolución con la edad de la proporción de linfocitos T y B sobre el total de linfocitos en la lámina propia del yeyuno en gazapos lactantes (Campín et al., 2003).



Como se puede observar en las figuras 3 y 4, entre los 19 y 26 días de edad se produce un cambio, tanto en la proporción de linfocitos totales como en su perfil, aumentando la proporción de linfocitos totales y la proporción de células B (Campín et al., 2003).

No hay estudios a mayor edad del animal por lo que no se sabe qué capacidad de respuesta relativa tienen los animales jóvenes. Distintos indicadores inmunitarios sugieren que el sistema inmune todavía no corresponde al de un animal adulto y por lo tanto un gazapo entorno al destete es más sensible a la agresiones de patógenos.

2.4.- Consecuencias del destete

En este contexto de inmadurez inmunitaria, el destete implica cambios sustanciales que pueden cambiar su capacidad de respuesta. El destete supone una situación de estrés para el animal debido a la separación de la madre y, en muchos casos, al cambio de alojamiento y de grupo social. Además, hay un cambio de alimentación de leche/pienso a sólo pienso que supone un descenso en la ingestión de inmunoglobulinas procedentes de la

leche y en el consumo de nutrientes (Gallois et al., 2005), que puede no llegar a cubrir la necesidades del animal tanto para crecimiento como para el desarrollo del intestino y de sus capacidades digestivas, e inmunitarias. Sin embargo, también se han observado situaciones que pueden llevar a pensar que el destete acelera la maduración de estas capacidades.

El cambio de alimentación produce a nivel del intestino delgado un empeoramiento de las características de la barrera intestinal. Gutiérrez et al. (2002) observaron una atrofia intestinal acompañada de una reducción de las actividades de enzimas ligadas a la mucosa intestinal. Esto indica que, no sólo se ha producido un cambio en la estructura de la mucosa, sino también en su capacidad funcional que puede facilitar la translocación de bacterias. Además, esto tiene una consecuencia a nivel del suministro de nutrientes ya que la digestibilidad de estos animales empeora si la comparamos con un animal adulto. La llegada al ileon terminal de una mayor cantidad de sustrato indigerido puede cambiar también la microbiota bacteriana, con consecuencias variables dependiendo si se ve favorecida o no la flora patógena. Al contrario de lo que sucede en el intestino delgado, el desarrollo del intestino grueso parece que se ve favorecida por el destete (Xiccato et al., 2001; Gutiérrez et al., 2002; Gallois et al., 2005) y por lo tanto podría producirse una mayor colonización bacteriana que ayudase al desarrollo y diversificación del sistema inmune.

Cuando se estudió el efecto del destete sobre el desarrollo del tejido folicular del apéndice vermiforme y las placas de Peyer (Carabaño et al., sin publicar) no se observaron cambios en el número de folículos, pero sí en el desarrollo de éstos en el apéndice vermiforme (cuadro 1). A nivel de la lámina propia, se observó un aumento de linfocitos sin cambios en su perfil. Sin embargo, los animales destetados mostraron una mayor proporción de células T indiferenciadas que respondieron al doble marcaje CD4+/CD8+. Estos resultados sugieren que el destete puede acelerar la madurez del sistema inmune pero, como se indicaba anteriormente, presenta síntomas de inmadurez.

2.5.- Efecto de la dieta sobre la barrera intestinal

De todo lo anteriormente expuesto se deduce que los mecanismos que permiten sobrevivir a un animal ante una infección son muy complejos, por lo que diseñar dietas que tengan en cuenta todos los procesos implicados de manera simultánea no es sencillo. Además, cuando se iniciaron estos estudios apenas existían resultados previos sobre el efecto que podía tener la dieta sobre los mecanismos de la barrera intestinal y sobre la flora intestinal (saprofita o patógena) ni en otros monogástricos ni en el conejo. Esto era especialmente importante en el caso de la EEC del conejo, en la ni siquiera se había identificado la flora responsable. En este contexto, la decisión que tomamos fue tratar de estudiar el efecto que podría tener la dieta sobre todos los factores implicados, eligiendo

los criterios de estudio que más útiles habían sido para caracterizar la barrera intestinal y el estudio de la microbiota en otras especies. En el caso de la barrera intestinal, los criterios que mejores resultados habían dado en otras especies habían sido el estudio de la morfología de la mucosa, la actividad de enzimas ligadas a la mucosa (como indicador de funcionalidad y madurez y que complementa la información anterior) y el estudio del perfil linfocitario de la lámina propia (como indicador de la respuesta inmune en el animal). En el caso del estudio de la microbiota optamos por técnicas moleculares que nos permiten tener conocimiento tanto de la microbiota cultivable (sólo un 30% de la total) como de la no cultivable por métodos clásicos.

Cuadro 1.- Efecto del destete (25 días de edad) sobre los órganos linfoides y los linfocitos de la lámina propia de gazapos a los 32 días de edad (Campin et al., 2003).

	Lactantes	Destetados Dieta soja - 48	Destetados Dieta girasol - 36	SEM	P
<i>Apéndice vermiforme</i>					
nº de folículos	32,3	34,4	33,4	1,16	NS
Area folicular (mm ²)	3,0 ^b	3,98 ^a	3,92 ^a	0,33	0,05
<i>Placas de Peyer</i>					
nº de folículos	7,32	7,46	6,86	0,43	NS
Area folicular (mm ²)	3,62	3,91	3,41	0,31	NS
<i>Lamina Propia</i>					
Linfocitos (% s total)	0,44 ^b	0,94 ^a	1,18 ^a	0,13	0,05
Linfocitos CD8+ (%)	21,5	24,7	28,5	4,2	NS
Linfocitos CD4+	19,9	14,0	18,9	2,85	NS
Linfocitos CD8+/CD4+	4,6 ^b	13,0 ^a	12,1 ^a	1,8	0,05

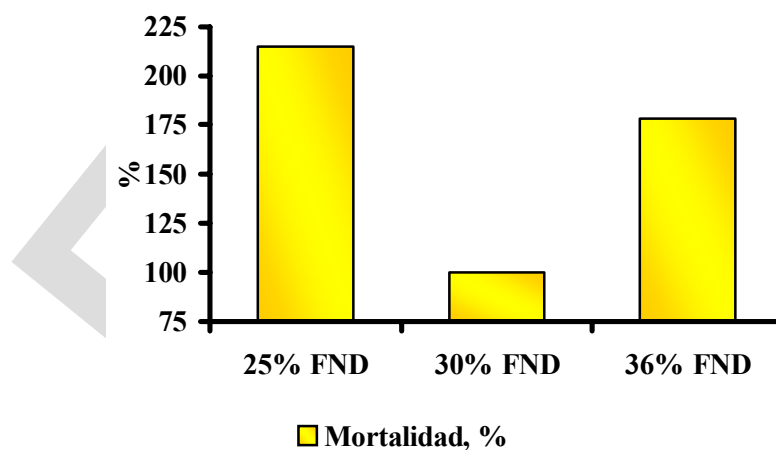
En el caso de la nutrición, ante la escasa y contradictoria información existente (de Blas et al., 1999a), la estrategia fue la de tratar de minimizar el estrés producido por el cambio de alimentación tratando de imitar lo que consumía un gazapo en el momento del destete. De acuerdo con la información revisada (de Blas et al., 1999a), los gazapos a 25 días de vida consumen una mezcla de leche y pienso que da como resultado una ingestión de nutrientes altamente digestibles, y una composición rica en grasa y proteína y con menor contenido en fibra que los piensos comerciales que se estaban suministrando al gazapo en el momento del destete. Teniendo en cuenta que las capacidades digestivas para la hidrólisis de los componentes de la dieta estaban limitadas en estas edades (especialmente para grasa y almidón), decidimos cambiar el pienso de crecimiento de una manera moderada para que la dieta fuese también práctica.

Los factores de la dieta que más relación guardaban con la aparición de las enfermedades digestivas eran el nivel y tipo de fibra (de Blas et al., 1999 b; Gidenne, 2000) y el nivel de proteína (Carabaño et al., 2002).

2.5.1.- Fibra

El papel beneficioso que se le ha atribuido a la fibra sobre la prevención de las enfermedades digestivas se ha basado fundamentalmente en el control de la microbiota intestinal a través de sus efectos sobre el tránsito digestivo y su utilización como sustrato de crecimiento de bacterias. Los resultados obtenidos utilizando fuentes de fibras usuales (alfalfa, paja y salvado) muestran que una reducción del contenido en fibra del 36 al 30% de FND reduce la mortalidad (figura 5), mejora los rendimientos productivos (Gutiérrez et al., 2002) sin cambios en la estructura de la mucosa. Sin embargo, una reducción adicional hasta el 25% de FND vuelve a favorecer la aparición de problemas debidos a enteropatía por cambios en la microbiota y aumentos de la retención cecal de la digesta (Nicodemus et al., 2004). De estos trabajos se deduce que un nivel de fibra elevado en piensos de destete puede sobrepasar la capacidad fermentativa del ciego, que a estas edades también se encuentra limitada, y favorecer el crecimiento de los patógenos.

Figura 5. Efecto del nivel de fibra en piensos de destete sobre la mortalidad relativa (dieta 30%=100) en dos experimentos (Gutiérrez et al., 2002, Nicodemus et al., 2004).



Según los trabajos de Marounek et al. (1995), la población microbiana normal en el ciego de un gazapo de 28 días está limitada respecto a un animal adulto y capacitada especialmente para fermentar hidratos de carbono como pectinas y hemicelulosas. Por ello si queremos implantar una flora beneficiosa para mejorar la exclusión competitiva, el tipo de fibra puede ser importante. Además, el tipo de fibra puede afectar también a la estructura de la mucosa. En estudios realizados en conejos con dietas semisintéticas, se observa que el tipo de fibra también puede afectar a la barrera intestinal. La inclusión en la dieta de fibras solubles (pectinas) favorece el crecimiento de los villi intestinales y la

actividad de los enterocitos, mientras que la inclusión de fibras lignificadas producen una atrofia estructural y una menor actividad de las células intestinales (Chiou et al., 1994, García et al., 1997). Los resultados obtenidos con dietas de destete indican que el nivel de fibra soluble juega un papel importante en la reducción de la aparición de EEC (cuadro 2). La inclusión de niveles moderados de fibra soluble (15% de pulpa de remolacha y 5% de pulpa de manzana) respecto a dietas donde se incluyeron fibras más insolubles (15% de cascarilla de avena) mejora la estructura de la mucosa, su funcionalidad y la respuesta inmune. Además, se observaron descensos en la proporción de animales en los que se detectaba la presencia de *Clostridium perfringens* en ciego y de patógenos oportunistas como *Campilobacter* tanto en ileon como en ciego. Todos estos efectos resultan en una reducción de la mortalidad debida a enteropatía mucoide con dietas que incluyen niveles de fibra soluble en pienso del 11%.

Cuadro 2.- Efecto del tipo de fibra en dietas isofibrosas (30% sobre fresco de FND) sobre el estado de la barrera intestinal, flora patógena y mortalidad en gazapos de 35 días, destetados a 25 días (Gómez- Conde et al., 2004 y 2005)

Fibra soluble (% sobre fresco)	Pulpas 12	Alfalfa 10	C. de avena 8	P< F
<i>Barrera intestinal</i>				
Yeyuno				
Longitud de los villi, µm	721 a	567 b	492 c	0,05
Profundidad de criptas, µm	89 b	115 a	113 a	0,05
Sacarasa (U/mg tejido)	8500 a	7100 b	5400 c	0,05
<i>Lamina Propia</i>				
Linfocitos CD4+ (%)	35	33	26	NS
Linfocitos CD8+ (%)	21b	27b	31 ^a	0,05
C. perfringens (% de detección)	8b	6b	19 ^a	0,05
Mortalidad 25- 60 días (%)	5,3b	8,5ab	14,4 ^a	0,05

Además de estos estudios se deduce que, al igual que ocurre en otras especies con patologías causadas por *Clostridium perfringens*, la barrera intestinal puede jugar un papel fundamental en la prevención de la enteropatía mucoide. Mantener la integridad de la mucosa es un objetivo prioritario.

En la práctica esto es importante ya que las dietas tienden a tener cantidades de fibra soluble muy bajas para cubrir los elevados niveles de lignina recomendados. En España es frecuente la introducción en las dietas de cascarilla de girasol, avena, paja o granilla de uva a costa de reducir fuentes de fibra más fermentables. En situaciones en las que la alfalfa es de mala calidad la situación puede agravarse y los niveles de fibra soluble que presenta el pienso pueden ser muy reducidos.

2.5.2.- Proteína

Las necesidades de proteína son altas en las primeras etapas del crecimiento para todos los animales, no sólo para cubrir las necesidades de crecimiento (Trocino et al., 2000), sino también las necesidades de la renovación y mantenimiento de la mucosa intestinal. El crecimiento intestinal es máximo desde el nacimiento hasta los 35 días de edad (Lebas y Laplace, 1972). En cerdos se estima que el 80% de las necesidades de proteína para mantenimiento se deben al mantenimiento de la funcionalidad de la mucosa.

El destete puede además cambiar, no sólo las necesidades de proteína totales, sino también las de los aminoácidos. Debido al menor crecimiento de los gazapos, en los primeros días tras el destete, el mayor peso de las necesidades de mantenimiento puede elevar las necesidades en aminoácidos esenciales y no esenciales por encima de las necesidades de crecimiento. Además, los mecanismos de defensa de la barrera intestinal pueden tener necesidades específicas de aminoácidos. Así, la treonina es un componente mayoritario de las proteínas de la mucina y el glutámico, principal aminoácido utilizado por los enterocitos como fuente energética, juega un papel esencial en los mecanismos de reparación de la mucosa (Le Floch y Seve, 2000; Reeds, 2000).

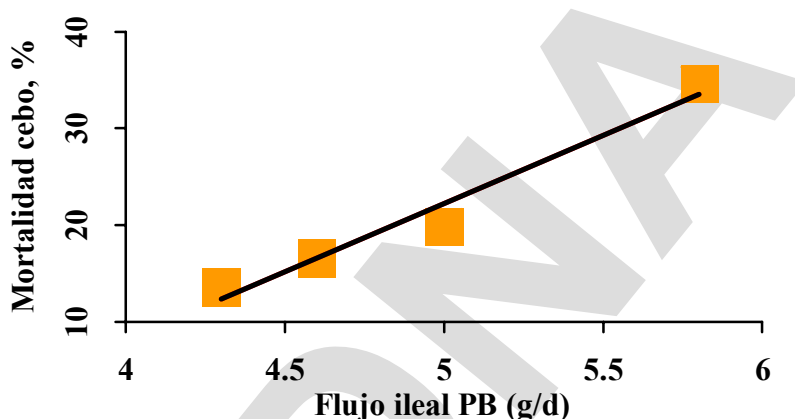
El cambio de alimentación en el destete, no sólo implica un cambio en el nivel de proteína del pienso, sino también en la fuente. Las proteínas de la leche de fácil digestión se cambian por proteínas vegetales de peor digestión y, en muchos casos, con presencia de factores antinutritivos que pueden dañar la mucosa intestinal e incrementar el flujo de nitrógeno hacia el ciego. En el caso de gazapos, se ha observado que la sustitución de proteínas vegetales por proteínas de plasma mejora la integridad de la mucosa (Gutiérrez et al., 2000). Debido a la prohibición de las harinas de origen animal en las dietas de los animales, las únicas alternativas viables para incluirse en piensos de destete son las proteínas de origen vegetal.

Las fuentes de proteína vegetal incluidas en las dietas postdestete mostraron una influencia sobre la mortalidad debida a EEC (Gutiérrez et al., 2003). En dietas con igual contenido en PB (18% sobre fresco) y PB digestible a nivel fecal, un aumento de digestibilidad en ileon, redujo el flujo ileal de proteína y la mortalidad. Las fuentes que más flujo ileal de proteína produjeron fueron las dietas que contenían harina de soja 48 (figura 6). Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en lechones, no se observaron cambios ni en la estructura de mucosa ni en el perfil de linfocitos de la lámina propia (cuadro 1).

La importancia de la reducción del flujo de proteína en el ileon (mediante la utilización de fuentes más digestibles o bajando el nivel de proteína) sobre la mortalidad, ha sido corroborada en experimentos posteriores (García et al., 2004, Chamorro et al.,

2005). De igual modo que en el estudio previo, en estos últimos estudios, no se observaron efectos de la dieta sobre la mucosa intestinal aunque si aumentos en la presencia de *C. perfringens*. En todos estos experimentos se aseguró un aporte de aminoácidos esenciales y los niveles de proteína digestible fueron altos, por lo que el efecto sobre la mucosa puede no ser evidente. Sin embargo, es necesario profundizar más sobre las necesidades de aminoácidos para el desarrollo de los mecanismos de defensa de la barrera intestinal.

Figura 6.- Efecto del flujo ileal de proteína sobre la mortalidad (%) en el periodo de cebo (Gutiérrez et al., 2003).



3.- FUTUROS ESTUDIOS

Además de la fibra y la proteína, otros nutrientes como ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales pueden ser necesarios para el desarrollo del sistema inmune y la barrera intestinal.

Como se mencionó en la introducción, las estrategias nutricionales no son fáciles de desarrollar ya que existen numerosas interacciones entre todos los factores implicados pero, a medida que se avanza en el conocimiento, se observa que son una vía útil para controlar las enfermedades digestivas.

4.- REFERENCIAS

CAMPING, J., EIRAS, P., REBOLLAR, P.G. y CARABAÑO, R. (2003) *ITEA* 24: 660-662.

CARABAÑO, R., GARCÍA, J. y DE BLAS, C. (2002) *Nitrogen digestion and digestive disorders at weaning. A review*. Joint Scientific meeting WG1 (Reproduction) and

- WG4 (Nutrition) –COST Action 848& ECVAN. JRC Ispra, Varesse (Italia). Actas de la reunión (C Boiti, T Gigenne and E. Sabbioni, Ed). pp 42-45.
- CHAMORRO, S., GÓMEZ-CONDE, M.S., PÉREZ DE ROZAS, A.M., BADIOLA, I., CARABAÑO, R. y DE BLAS, C. (2005) En: *XXX Symposium de Cunicultura de ASESCU*. Valladolid. pp.: 135-142.
- CHIOU, P.W.S., YU, B. y LIN, C. (1994) *Comp. Biochem. Physiol. A.* **108**: 629-638.
- DASSO, J.F., OBIAKOR, H., BACH, H., ANDERSON, A.O. y MAGE, R.G. (2000) *Devolp. Comp. Immol.* **24**: 797-814.
- DE BLAS, J.C., GUTIÉRREZ, I. y CARABAÑO, R. (1999a) En: *XV Curso de Especialización FEDNA*. Barcelona. pp.: 67-81.
- DE BLAS, C., GARCÍA, J. y CARABAÑO, R. (1999b) *Ann. Zootech.* **48**: 3-13.
- GALLOIS, M., GIDENNE, T., FORTUN-LAMOTHE, L., LE HUEROU-LURON, I. y LALLES, J.P. (2005) *Repro. Nutr. Dev.* **45**: 109-122.
- GARCÍA, A.I., GARCÍA, J., DE BLAS, C., PIQUER, J. y CARABAÑO, R. (1997) *ITEA* **18**(1): 190-192.
- GARCÍA, J., GARCÍA, A.I., GARCÍA-REBOLLAR, P., DE BLAS, C. y CARABAÑO, R. (2004) En: *8th World Rabbit Congreso*. Puebla, México, 7-10 september 2004. pp.: 427-432.
- GIDENNE, T. (2000) *W. Rabbit Sci.* **8**: 23-32.
- GÓMEZ-CONDE, M.S., CHAMORRO, S., NICODEMUS, N., DE BLAS, C., GARCÍA, J. y CARABAÑO, R. (2004) En: *Actas del XXIX Simposium de Cunicultura*. Lugo. pp.: 157-163.
- GÓMEZ-CONDE, M.S., CHAMORRO, S., REBOLLAR, P.G., EIRAS, P., GARCÍA, J. y CARABAÑO, R. (2005) *ITEA* **26**: 415-419.
- GUTIÉRREZ, I., CACHALDORA, P., CARABAÑO, R. y DE BLAS, C. (2000) *World Rabbit Science* **8** Suppl 1 (C): 263-268.
- GUTIÉRREZ, I., ESPINOSA, A., GARCÍA, J., CARABAÑO, R. y DE BLAS, J.C. (2002) *J. Anim. Sci.* **80**: 1029-1037.
- GUTIÉRREZ, I., ESPINOSA, A., GARCÍA, J., CARABAÑO, R. y DE BLAS, C. (2003) *Anim. Research* **52**: 461-472.
- HAMPSON, D.J., PLUSKE, J.R. y PETHICK, D.W. (2001) En: *Digestive Physiology of Pigs*. Ed. J.E. Lindberg y B. Ogle. CABI Publishing. pp: 247-260.
- HEZCKO, U., ABE, A. y FINLAY, B.B. (2000) *Micorbed and Infection* **2**: 5-16.
- HILL, R.R.H. (1986) *Curr. Microbiol.* **14**: 117-120.
- KELLY, D., CONWAY, S. y AMINOV, R. (2005) *TRENDS in immunology* (en prensa).
- KNIGHT, K.L. y CRANE, M.A. (1994) *Adv. Immunol.* **56**: 179-218.
- KNIGHT, K.L. y WINSTEAD, C.R. (1997) *Immunology* **9**: 228-232.
- LANNING, D., SETHUPATHI, P., RHEE, K.J., ZHAI, S.K. y KNIGHT, K.L. (2000) *J Immunol.* **165**: 2012-9.
- LEBAS, F. y LAPLACE, J.P. (1972) *Ann. de Zootech.* **21**: 337-347.
- LE FLOC'H, N. y SEVE, B. (2000) *Prod. Anim.* **13**: 303-314.

- MANTLE, M. y THAKORE, E. (1988) *Biochem. Cell Biol.* 66: 1045-1054.
- MANTLE, M., BASARABA, L., PEACOCK, S.C. y GALL, D.G. (1989) *Infection and Immunity* 57: 3292-3299.
- MANTLE, M. y HUSAR, S.D. (1994) *Infection and Immunity* 62: 1219-1227.
- MAROUNEK, M., SKRIVANOVA, V. y DUSKOVA, D. (2000) *J. Agric. Sci. Camb.* 135: 437-442.
- McCLANE, B. (2001) *Toxicon.* 39: 1781- 1791.
- NICODEMUS, N., PÉREZ-ALBA, L., CARABAÑO, R., DE BLAS, C., BADIOLA, I., PÉREZ DE ROZAS, A. y GARCÍA, J. (2004) En: *8th World Rabbit Congress*. Puebla (Méjico)
- PERÉZ DE ROZAS, A.M., CARABAÑO, R., GARCÍA, J., ROSELL, J., DÍAZ, J.V., BARBÉ, J., PASCUAL, J.J. y BADIOLA, I. (2005) En: *XXX Symposium de Cunicultura*. Valladolid. España. pp: 167-174.
- REEDS, P.J. (2000) *J. Nutr.* 130:1835S-1840S.
- ROTHKÖTTER, H.J., KIRSHOFF, T. y PABST, R. (1994) *Gut.* 35: 1582-1589.
- SIROTEK, K., SANTOS, E., BENDA, V. y MOROUNEK, M. (2003) *Acta Vet. Brno.* 72: 365-370.
- STEPANKOVA, R. y KOVARU, F. (1978) En: Malek P, Bartos V, Weissleder H, Witte MH. Eds. *Lynphology*. Stuttgart: G. Thieme Publ. pp: 290-294.
- TLASKALOVA-HOGENOVA, H. y STEPANKOVA, R. (1980) *Folia Biol.* 26: 81-93.
- TROCINO, A., XICCATO, G., QUAQUE, P.I. y SARTORI, A. (2000) *World Rabbit Science* 8(Supl 1 C): 467-474.
- VAN DIJK, J.E., HUISMAN, J. y KONINKX, J.F.K.G. (2002) En: *Nutrition and Health of the gastrointestinal tract*. Wageningen Academic Publisher. pp: 71-96.
- XICCATO, G., TROCINO, A., SARTORI, A. y QUEAQUE, P.I. (2001) En: *9 Journées de la Recherche Cunicole*. Paris. pp.: 199-2002.