

Optimización de la nutrición proteica en el conejo: incidencia de la cecotrofia

_____ A. Belenguer, J. Bacells, M. Fondevilla, L. Abecia y M. Decoux

Belenguer(1), A., Bacells(1), J., Fondevilla(1), M., Abecia (1) , L., y Decoux(2), M.

(1) Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza.

(2) Cargill S.L. Passeig de Sant Joan 184. Barcelona

Resumen

En el presente trabajo se analizó la incidencia, sobre diferentes parámetros productivos, de la fijación del collar cervical como método para prevenir y cuantificar la producción de heces blandas o cecotrofos en conejos en crecimiento. En general, la fijación del collar dió lugar a un descenso significativo en el consumo voluntario de materia seca (de 97.56 a 71.83 g/d), caracterizado por una elevada variación residual (CV=35 %) y que tras diez días de adaptación los animales no alcanzaron los niveles de consumo iniciales. En un segundo experimento se analizó el efecto de la permanencia del collar sobre la excreción de heces blandas, nuestros resultados muestran una correlación negativa entre el tiempo de permanencia del collar y la excreción de cecotrofos. En cierta medida, el descenso en la producción de cecotrofos indicaría el grado de la alteración que dicha metodología ejerce sobre la función que se pretende determinar. Finalmente, se evaluó la excreción urinaria de DP como índice indirecto de la producción de proteína microbiana y cecotrofos. Para ello se suministraron diferentes raciones en las que se modificó el tipo y nivel de carbohidratos en raciones administradas ad libitum. Aunque ambos métodos de estimación mostraron idénticos patrones de respuesta en la excreción de heces blandas, los niveles de reciclaje de nitrógeno determinados a partir de la excreción urinaria de DP (1.99g/d) fueron más elevados que los obtenidos a partir de la fijación de collares (0.93 g/d). A partir de la información existente es difícil concluir cual es el valor real dado que ambas metodologías están sujetas a importantes fuentes de error.

Abstract

In our laboratory some trials were carried out in order to evaluate caecotrophes or soft faeces production in growing rabbits using the conventional methodology (neck collar) and/or urinary excretion of purine derivatives as a indirect index.

When caecotrophes excretion was estimated by fitting neck collar during ten days, a significant decrease in feed intake was recorded (from 97.56 to 71.83 g DM/d). Besides, variation in soft faeces production were also recorded when collar was fitted during different periods. Effectively, a negative correlation was observed and soft faeces production decreased from 18 ± 0.81 g/d at 24 h collection period to 8 ± 0.61 g/d at 240 h collection period. Finally, collar fitting and PD excretion were compared as estimation methods, when animals were fed diets with different type and level of carbohydrates. Although the effect of the experimental treatment was similar with both methodologies, PD excretion rented a higher level of nitrogen recycling than collar fitting method (1.99 vs 0.93 g/day). However, it is difficult to conclude what's the true value given that a permanent standard does not exist.

Introducción

Los mamíferos herbívoros tienen un sistema enzimático incapaz de digerir los carbohidratos estructurales (fibra). Para ello, estas especies han desarrollado compartimentos digestivos que reúnen las condiciones necesarias para alojar a una flora simbiótica que les permita fermentar la fibra. Este compartimento se localiza bien de forma previa a la digestión enzimática (fermentación pre-gástrica) o en el tracto posterior (fermentación ceco-colónica). Mientras que los fermentadores pre-gástricos aprovechan la proteína microbiana resultante de estos procesos de fermentación, en el caso de los fermentadores ceco-colónicos, este material nutritivo de elevado valor biológico es despreciado con las heces. Sin embargo, los lagomorfos han desarrollado un sistema, la cecotrofia, que les permite reciclar la mayor parte de la proteína microbiana sintetizada en el tracto inferior. Este mecanismo combina una retención selectiva de fluidos y pequeñas partículas en el ciego con cierta forma de coprofagia, de forma que los animales reingieren un tipo especial de heces llamadas heces blandas o cecotrofos. Tradicionalmente, la cecotrofia en el conejo ha sido determinada mediante la utilización de un collar cervical que evita la reingestión de cecotrofos y con ello este material cecal puede ser colectado y medido. No obstante, la cecotrofia forma parte de la fisiología del conejo y tanto impedirlo requiere modificar el proceso que se intenta describir. Por todo ello, la cecotrofia es quizás el elemento que confiere una mayor incertidumbre en el establecimiento de sistemas de alimentación y racionamiento para el conejo.

El objetivo de este trabajo es el de evaluar el efecto de la fijación del collar cervical sobre diversos parámetros productivos en conejos en crecimiento.

Material y métodos

Experimento 1. Incidencia de la fijación del collar sobre los niveles de ingestión voluntaria en conejos en crecimiento

Se utilizaron 6 conejos macho de raza Neozelandesa en periodo de cebo con una edad aproximada de 45 días y 1.6 kg de peso vivo (PV). Estos animales se alojaron en jaulas metabólicas durante todo el periodo experimental. Tras 5 días de adaptación a la dieta, se fijaron los collares cervicales (5 cm d.i. y 25 cm d.e.) y permanecieron de esta forma durante 10 días. La ingestión de alimento se controló durante todo el desarrollo experimental.

Durante los últimos 5 días se colectaron de forma conjunta las heces y los cecotrofos, siendo congeladas inmediatamente a -20°C . La dieta experimental fue formulada en base a heno de gramíneas (35.4 %), soja (15.6 %), cebada (25.3 %), pulpa de remolacha (20 %), aceite vegetal (3.5 %) y suplemento vitamínico-mineral (0.2 %), y su composición química se presenta en la tabla 1.

El contenido en materia seca (MS) del alimento y cecotrofos se determinó mediante desecación en estufa (60°C 48 horas). Las muestras una vez secas se molieron a 1 mm para el resto de determinaciones analíticas. El contenido del alimento en cenizas se determinó mediante incineración en mufla a 550°C durante 8 horas. La determinación total de N (en fresco) se llevó a cabo mediante el método Kjeldhal siguiendo la modificación del ácido bórico propuesta por Scales y Harrison (1920). La determinación de FND y FAD en alimento se realizó según el método propuesto por Goering y Van Soest (1975) realizando un pre-tratamiento amilolítico (Van Soest y col., 1991).

Tabla-1

Composición química de la ración experimental	
Composición química (g/kg)	
Materia seca	942,5
Materia Orgánica	925,1
Proteína Bruta	174,4
FND	297
FAD	152,9

Experimento 2. Incidencia del tiempo de colección sobre los niveles de excreción de cecotrofos en conejos en crecimiento

En nuestro laboratorio se han realizado diversos ensayos en los que se ha modificado el tiempo de colección o permanencia del collar cervical. A continuación se describe brevemente el desarrollo experimental de cada uno de ellos.

1. Belenguer y col., (2002) : 64 conejos macho de raza Neozelandesa, de unos 45 días de edad y 1.5-1.6 kg de PV, fueron distribuidos en grupos de 8 animales, y recibieron diferentes dietas experimentales formuladas en base a dos fuentes de carbohidratos solubles (cebada o maíz), dos fuentes de carbohidratos estructurales (heno de alfalfa o pulpa de remolacha), y dos niveles de inclusión de fibra (alto - 40-42 % FND - y bajo -27-31 % FND). Los animales recibieron cada ración durante 21 días procediendo el último día de cada periodo experimental a la colocación del collar que se mantuvo durante 24 h .
2. Balcells y col., (1998): Se utilizaron 7 animales macho de raza Neozelandesa, de unos 75 días de edad y 2.5 kg de PV. Se alojaron en jaulas metabólicas, y tras 6 días de adaptación de los animales a la dieta, se fijaron los collares cervicales y estos se mantuvieron durante 7 días. La dieta se formuló en base a heno de prado (50 %), cebada (40.5 %), caseína (7.5 %) y un suplemento vitamínico-mineral (2 %).
3. Belenguer y col. (2003). El tercer ensayo corresponde al desarrollo experimental descrito en el Experimento 1, y los collares se mantuvieron durante 10 días.

Experimento 3. Excreción de derivados púricos como método alternativo a la fijación del collar. Ingestión de N microbiano con ambos métodos (Belenguer y col., 2002)

Se utilizaron 64 conejos machos de raza Neozelandesa en periodo de cebo con una edad aproximada de 45 días y un peso vivo entre 1,5 y 1,6 Kg. Estos animales se distribuyeron en lotes de 8 individuos y cada lote recibió una de las raciones experimentales administradas "ad libitum" descritas en la tabla 2. Las raciones se formularon para modificar la ingestión de carbohidratos no estructurales (CNS) y estructurales (CHE). Cada periodo experimental tuvo una duración de 21 días y durante la última semana se procedió a la colección de orina, heces fijando el último día los collares cervicales para evitar la cecotrofia y permitir la colección de cecotrofos. Tras la colocación del collar se recogieron conjuntamente las heces secas y cecotrofos, que se almacenaron a -21°C. La orina se recogía diariamente en recipientes que contenían ácido sulfúrico para mantener niveles de pH < 3 y evitar su contaminación. La alícuota de orina se pesó diariamente y un 10 % del total se diluyó hasta 200 ml. con agua destilada para evitar la precipitación del ácido úrico, almacenándose conjuntamente los 4 días de colección a -20 °C hasta el posterior análisis.

El contenido en MS del alimento y cecotrofos se determinó mediante desecación en estufa (60°C 48 horas). Las muestras una vez secas se molieron a 1 mm. para el resto

de determinaciones analíticas. El contenido en cenizas se determinó mediante incineración en mufla a 550°C durante 8 horas. La determinación total de N del alimento y cecotrofos se llevó a cabo mediante el método Kjeldhal siguiendo la modificación del ácido bórico propuesta por Scales y Harrison (1920). La determinación de FND y FAD en alimento se realizó según el método propuesto por Goering y Van Soest (1975) realizando un pretratamiento amilolítico (Van Soest y col., 1991).

Los DP en orina (alantoína, ácido úrico, xantina, hipoxantina) fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Balcells y col., 1992) con la modificación propuesta por Martín-Orué y col. (1995) para determinar las bases puricas en las muestras de alimento y cecotrofos. La relación entre la excreción de cecotrofos/proteína microbiana y la excreción urinaria de DP se realizó a partir del modelo propuesto por Balcells et al (1998).

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza según un diseño factorial 2 x 2 x 2 en el que se determinó la significación de los factores a estudio (tipo de carbohidrato no estructural, TCN; tipo de carbohidrato estructural, TCE y nivel de inclusión de carbohidratos, NC).

Tabla-2

Composición bormatológica (% sobre MF) y química (% sobre MS) de las raciones experimentales formuladas en base a dos tipos de CNS (cebada -C- y maíz -M-) y de CHE (heno de alfalfa -H- y pulpa de remolacha -P-) administrados a dos niveles (alto -A- y bajo, -B-)								
Ingredientes	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7	Dieta 8
	ACBP	BCAP	AMBP	BMAP	BCAH	ACBH	BMAH	AMBH
Maiz fino			40,98	12,38			13,41	40,53
Cebada	44,03	14,86			14,85	44,03		
Alfalfa granulada	8,25	17,34	8,43	17,33	51,49	24,02	52,04	24,82
Pulpa remolacha	23,96	51,49	25,62	51,5	16,84	8,23	17,35	8,36
Paja tratada	5	4,95	5,12	4,95	4,95	6	4,98	6,08
Soja 48	16,91	9,49	18,93	11,96	9,9	15,01	10,04	17,48
Carbonato cálcico	0,95					1,5		1,52
Excipiente	0,9	0,89	0,92	0,909	0,89	0,9	0,89	0,909
Sal					0,09	0,3	0,3	0,3
Aceite Girasol		0,98		0,99	0,99		0,99	

Composición química (%MS)								
Materia seca	93,37	94,35	92,66	93,38	94,14	92,43	93,64	92,24
Materia orgánica	94,04	93,55	95,04	93,57	91,14	92,13	91,23	93,14
Proteína bruta	17,62	14,97	17,14	15,16	17,33	17,83	16,75	16,61
Fibra neutro detergente	28,22	41,66	31,7	42,99	40,27	29,28	40,92	27,46
Fibra cido detergente	17,25	24,26	18,00	24,45	26,59	18,15	26,16	16,53

Resultados y discusión

Incidencia de la fijación del collar sobre los niveles de ingestión voluntaria en conejos en crecimiento.

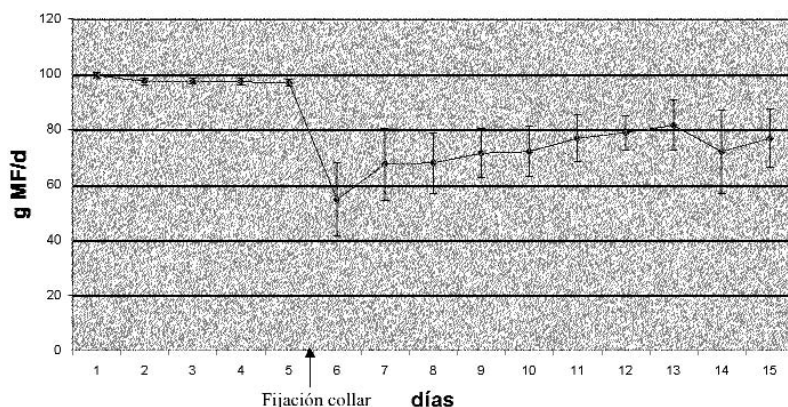
La fijación del collar implica una situación adicional de "stress" en los animales experimentales que conlleva a una alteración en los niveles de ingestión de materia seca, que

es además irregular entre individuos. La presencia del collar se evidencia también al reflejarse en otros parámetros digestivos como el ritmo de paso (Fraga et al., 1991). Este hecho fue especialmente evidente en nuestros resultados y así se refleja en la figura 1. El nivel de ingestión de materia seca previo a la fijación del collar fue 97.56 ± 0.506 g/d, mientras que este valor descendió a un valor medio de 71.83 ± 3.262 g/d, correspondiendo esta ingestión a los 10 días siguientes a la fijación del collar. En la figura 1 se observa como el primer día se produce un descenso más evidente que posteriormente se recupera, pero sólo de forma parcial, sin llegar en ningún momento a los niveles de ingestión iniciales. En cualquier caso, la variabilidad fue elevada (CV=35 %) , con unas variaciones en los niveles de descenso del 0 al 80 % entre individuos.

Similares conclusiones fueron descritas por Carabaño y col. (2000), quienes en un estudio en el que resumieron los resultados obtenidos en varios laboratorios describen una reducción significativa en los niveles de ingestión que a su vez se caracterizaba por una elevada variabilidad. Por otra parte, indican la incapacidad de aprendizaje de los animales al repetir el mismo comportamiento cuando el collar era fijado más de una vez. En dicho estudio se habla de factores incontrolados, además del estrés, como posibles causas del descenso en la ingestión. En este sentido, Fraga y col. (1991) observaron una reducción significativa del tiempo medio de retención independiente del nivel de ingestión cuando era fijado el collar cervical para evitar la cecotrofia.

Es difícil establecer una o varias causas concretas del descenso en la ingestión, pero lo que está demostrado claramente es que el collar aleja al animal de su estado fisiológico normal.

Figura 1. Descenso de la ingestión de materia fresca (g/d) de alimento cuando se procedió a la fijación del collar cervical (5 cm Δ interno; 25 cm Δ externo).



Incidenca del mantenimiento del collar sobre la excreción de cecotrofos en conejos en crecimiento

En la tabla 3 se presenta la excreción de cecotrofos obtenida en las tres ensayos en los que se modificó el tiempo de permanencia del collar, las raciones eran de similares características y en ningún caso podrían explicar las variaciones registradas en las experiencias descritas. De la tabla se desprende la relación inversa entre el tiempo de colección y la materia seca excretada.

Tabla-3

Evolución de la excreción de cecotrofos con el tiempo de permanencia del collar para la colección de cecotrofos.		
Periodo de colección	Excreción cecotrofos (g/d)	Referencia
24 h.	18 ($\pm 0,81$)	Belenguer y col., 2002
168 h.	11 ($\pm 0,86$)	Balcells y col., 1998
240 h.	8 ($\pm 0,61$)	Belenguer y col., 2003

Los valores obtenidos para un periodo de colección de 24 h se encuentra dentro del rango descrito para este período (15-30 g MS/d: Perez y col., 1997; Nicodemus y col., 1997; Carabaño y col., 1988; Carabaño y col., 2000; Motta-Ferreira y col., 1996; Gidenne y Lebas, 1987). aunque los niveles de excreción registrados por Fraga y col (1991) en un periodo de 72 horas (7.5-11.5 g MS/d) confirmaría la tendencia de nuestros resultados. Dada esta relación es difícil establecer valores absolutos para la re-ingestión de heces blandas, y podría, en todo caso, considerarse un método adecuado cuando se trata de comparar dos o mas raciones, manteniendo los protocolos de colección. Sin embargo y a la luz de los resultados presentados resulta comprometido hipotetizar sobre un valor absoluto o real (g/d) de la re-ingestión de heces blandas y con ello se hace patente la dificultad de integrar la cecotrofia en los nuevos sistemas de alimentación en el que se considere como esencial el reciclaje de N endógeno, en el caso del conejo, de origen fundamentalmente microbiano.

Excreción urinaria de Derivados púricos: una alternativa a los collares cervicales.

En el experimento 3 la excreción media de cecotrofos fue de $18 \pm 0,81$ g MS/d, y como ya se ha indicado coincidió en general con los valores obtenidos en trabajos previos: Motta-Ferreira y col. (1996); Perez y col. (1997); Nicodemus y col. (1997); Gidenne y Lebas (1987); Carabaño et al. (1988), y Carabaño y col. (2000). El efecto del tratamiento experimental sobre el reciclaje de N se presenta en la tabla 4.

En la tabla 4 se presentan también los valores de reciclaje de N estimados a partir de la excreción urinaria de derivados púricos, utilizando el modelo de respuesta propuesto por Balcells et al (1998). La utilización de derivados púricos como estimadores refleja las variaciones obtenidas mediante el collar cervical y la correspondiente colección de cecotrofos, aquellas dietas con un mayor contenido en carbohidratos estructurales dieron lugar a una mayor excreción de cecotrofos ($P < 0.05$) particularmente en aquellos animales que recibieron heno de alfalfa como fuente de fibra ($P < 0.01$). No obstante, las estimaciones derivadas de la excreción de derivados púricos sobrestimaron de forma significativa la ingestión de N en relación a los valores procedentes de la colección de cecotrofos (1,99 vs. 0.93 g/d). La ventajas de la excreción de derivados púricos como estimador indirecto del consumo de proteína microbiana tiene la ventaja de no interferir en el fisiologismo digestivo del animal y por tanto la función que se pretende medir resulta inalterada. En cualquier caso, se trata de un marcador indirecto que necesita ser contrastado y no parece que los valores procedentes de la fijación del collar sean los valores mas adecuados para ello.

Tabla-4

Efecto de la inclusión en la dieta de maíz o cebada y heno de alfalfa o pulpa de remolacha como fuente de carbohidratos no estructurales (CNS) o estructurales (CHE), respectivamente así como su administración a dos niveles (alto CHE/bajo CHE) sobre el reciclaje de N estimado a partir de la colección de cecotrofos o la excreción renal de DP en conejos Neozelandeses alimentados "ab libitum"										
	Nivel CNS	Cebada	Maíz	Heno de alfalfa	Pulpa de remolacha	DE	TCN	TCE	NCH	Interacción
Reciclaje N DP	Bajo CHE	1,386	0,882	0,998	1,336	2,2563	NS	*	*	NCK-TCE**
	Alto CHE	2,282	2,999	3,986	1,331					
	μ	[1,815]	[2,136]	[2,547]	[1,333]					
Reciclaje N (cecotrofos)	Bajo CHE	0,830	0,882	1,014	0,653	0,3239	NS	***	*	NS
	Alto CHE	1,078	0,911	1,106	0,857					
	μ	[0,954]	[0,898]	[1,062]	[0,767]					

DE, desviación estándar; TCN, TCE, NCH, significación estadística de los efectos tipo CNS, tipo de CHE y nivel de CHE respectivamente; T, (P<0,1); *, (P<0,05); **, (P<0,01); ***, (P<0,001).

Bibliografía

- BALCELLS, J., GUADA, J.A., PEIRÓ, J.M. Y PARKER, D.S. (1992). Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 575: 153-157.
- BALCELLS, J., GANUZA, J.M., PÉREZ, J.F., MARTÍN-ORÚE, S.M. Y GONZALEZ RONQUILLO, M. (1998) Urinary excretion of purine derivatives as an index of microbial-nitrogen intake in growing rabbits. *British Journal of Nutrition* 79: 373-380.
- BELENGUER A., BALCELLS J., FONDEVILA M. Y TORRE C. (2002). Caecotrophes intake in growing rabbits estimated either from urinary excretion of purine derivatives or from direct measurement using animals provided with a neck collar: effect of type and level of dietary carbohydrate. *Animal Science*, 74:135-144.
- BELENGUER A., BALCELLS J. Y DECOUX M. (2003). Protein recycling in rabbits: a comparison between ¹⁵N-lysine incorporation with neck collar and urinary purine derivative excretion as a method to determine microbial N intake in growing animals. *British Journal of Nutrition* (en revisión).
- CARABAÑO R., GARCÍA A.I., BLAS E., FALCAO L., GIDENNE T. Y PINHEIRO V. (2000). Collaborative studies on caecotrophy in adult rabbits: effect of feed intake and methodology. 7th World Rabbit Science, 4-7 Junio 2000. Vol. C, pag. 153-159.
- CARABAÑO, R., FRAGA, M.J., SANTOMA, G. Y DE BLAS, J.C. (1988). Effect of diet on composition of cecal contents and on excretion and composition of soft and hard feces of rabbits. *Journal of Animal Science* 66, 901-910.
- FRAGA M.J., PÉREZ P., CARABAÑO R. Y DE BLAS J.C. (1991). Effect of type of fiber on the rate of passage end on the contribution of the soft feces to nutrient intake of finishing rabbits. *Journal of Animal Science* 69, 1566-1574.
- GIDENNE T. Y LEBAS F. (1987). Estimation quantitative de la caecotrophie chez le lapin en croissance: variations en fonction de l'âge. *Annales Zootechnie* 36 (3), 225-336.

GOERING H.K. Y VAN SOEST P.J. (1975). Forage fiber analysis. Agricultural Research Service. Agricultural Handbook nº 379 US Department of Agriculture.

MARTIN ORÚE, S.M., BALCELLS J., GUADA J.A. Y CASTRILLO C. (1995). Endogenous purine and pyrimidine derivative excretion in pregnant sows. *British Journal of Nutrition* 73, 375-385.

MOTTA-FERREIRA W., FRAGA M.J. Y CARABAÑO R. (1996). Inclusion of grape pomace, in substitution for alfalfa hay, in diets for growing rabbits. *Animal Sci.* 63, 167-174.

NICODEMUS N., GARCÍA J., CARABAÑO R., MÉNDEZ J. Y DE BLAS J.C. (1997). Efecto del tamaño de partícula sobre la digestión en conejos. ITEA, Volumen extra 18-Tomo I, 184-186.

PEREZ, J.F., AMBER K.H., BLAS E., MARTÍN-ORÚE S.M. Y BALCELLS J. (1997). Composición de las heces blandas de los conejos. Efecto del tipo y nivel de inclusión de cereal sobre su contenido en N y sobre la relación BP/N. ITEA, Volumen extra 18-Tomo I, 193-195.

SCALES F.M. Y HARRISON A.D. (1920). Boric acid modification of the kjeldhal method for crop and soil analysis. *J. Ind. Eng. Chem.* 12, 350-354.

VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B. Y LEWIS R.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.