

Efecto de una separación transitoria de la camada sobre parámetros digestivos, enzimáticos e histológicos de gazapos de 9 días de edad

Espinosa A.; Rebollar P.G. y Carabaño R.
Dpto. Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos.
Cdad. Universitaria sin. 28040 Madrid.

Resumen

El destete transitorio de la camada (48 horas) en gazapos lactantes de 9 días de edad es un método satisfactorio para estimular la actividad ovárica en conejas lactantes. La ausencia de amamantamiento y el ayuno podría perjudicar el crecimiento del gazapo e inducir cambios en la estructura intestinal y pérdida en enzimas digestivos. El objetivo de este estudio es conocer el efecto de este ayuno en gazapos de 9 días de edad y su repercusión directa en el peso relativo del tracto gastrointestinal, en la altura de las vellosidades intestinales y en la actividad enzimática del yeyuno. La lactación en el grupo control no fue interrumpida; a otro grupo de animales se les sometió a ayuno durante 48 horas. Las variaciones de peso vivo y de pesos relativos de los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal tras 48 horas de ayuno podría ser debido a la ausencia de ingestión de leche y a la pérdida de contenido del estomago, mas que a retrasos del crecimiento ($P < 0.05$). Se observó una reducción de un 13% en la longitud de las vellosidades intestinales (665 vs 579 μm ; $P < 0.05$) tras el ayuno, probablemente porque la ausencia de alimento en el tracto yeyunal tiene efectos directos en la proliferación de las células epiteliales y provoca una atrofia de las vellosidades.

La actividad lactásica se distribuye sobre todo a nivel apical de las vellosidades, por lo que se esperaba un descenso en la actividad específica de esta enzima tras 48 horas de ayuno. Sin embargo, un aumento en la cantidad de glucosa liberada ($P < 0.05$) y una menor concentración de proteína ($P < 0.05$) por gramo de yeyuno ha dado lugar a un incremento en la actividad específica de la lactasa ($P < 0.05$). Son necesarios más estudios para determinar si estos cambios afectan al posterior crecimiento y desarrollo del gazapo lactante.

Abstract

The transient doe-litter separation (48 h) in young nursing rabbits 9 days old is an useful method on stimulating ovarian activity in lactating does. The absence of suckling periods would impair the kit's growth, and induce changes in intestinal structure and specific loss of digestive enzymes. This study was aimed at characterising the impact of a 48 hours interval of fast in 9 days old rabbits and the direct effect on the relative weight of the gastrointestinal tract, height villous and yeyunal lactasa activity. The control group had free access to nursing and the fasted group were kept apart during 48 hours. No kits died in either group during the separation period. The variations on body weight and on the gastrointestinal segments relative weight after 48 hours fasting could be due to absence of milk intake and the lost of stomach content, more than a growth delay ($p < 0.05$). A reduction of 13% in villous height was observed (665 vs 579 μm ; $p < 0.05$) after fast, because the absence of food in

the yeyunal tract has direct effects on epithelial cell proliferation and results in villous atrophy. As a more apical villous distribution of the lactase activity is described, a lower specific lactase activity 48 hours fasted was expected. However, an increase of the glucosa liberated ($p < 0.05$) and a lower protein concentration ($P < 0.05$) per g of yeyune result in an increase of the specific lactase activity ($P < 0.05$). More studies are necessary to determine the effect of these changes on the following lactating young development and growth.

Introducción

En la mayoría de los sistemas de producción cunícola actuales se realizan ciclos semiintensivos de cubrición o inseminación artificial de 42 días. Las conejas se cubren el día 11 post-parto momento en el cual los efectos de la lactación son claramente negativos ya que la receptividad sexual y la fertilidad disminuyen, haciéndose necesarios métodos de estimulación ovárica (Lamb, 1991; Ubilla y Rebollar 1995). La separación transitoria de la camada desde el día 9 al 11 post-parto (48 horas) es uno de los métodos de manejo para estimular el celo en conejas lactantes (Ubilla y col., 2000 a,b)' En las primeras semanas tras el parto, la coneja solo emplea 2-3 minutos en el cuidado y amamantamiento diario de los gazapos, tiempo suficiente para que ingieran los nutrientes necesarios que les permitan sobrevivir hasta 48 horas sin mamar (Jilge 1995). Sin embargo este ayuno provoca un descenso en el peso vivo de los gazapos (Alvarino Y col., 1998), sin que se conozcan las consecuencias directas en el crecimiento, desarrollo y normal funcionamiento del tracto digestivo del lactante.

En edades tempranas el crecimiento del tracto digestivo del gazapo es especialmente intenso (Yu y Chiou, 1997) y una restricción de la ingestión de nutrientes provocada por una separación transitoria o debida al destete puede afectar negativamente al mismo. En gazapos destetados con 25 días de edad se ha observado una atrofia de vellosidades intestinales junto con alteraciones en la actividad específica de las enzimas localizadas en su borde apical (Gutierrez y col., 2000). Dicha afirmación ha sido corroborada en aves (Noy y Sklan, 1999) y en cerdos (Pluske y col., 1997), describiéndose además alteraciones en la capacidad digestiva y enzimática del intestino como consecuencia de la reducción en la longitud de las vellosidades intestinales.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de un ayuno de 24 6 48 horas sobre el peso del animal y de su tracto digestivo, así como sobre la estructura de la mucosa intestinal Y la actividad lactásica del yeyuno.

Material y métodos

Animales y alojamiento

Se han empleado 60 gazapos procedentes de conejas (Neozelandes Blanco x California) multiparas con un peso vivo medio de 3967:t 76g, de entre 3 y 5 partos y con mas de 7 gazapos por camada. En todas ellas se controló la lactación de las camadas desde el día del parto, mediante la apertura del nido a las 9 de la mañana y posterior cierre cuando las camadas habían mamado. El día 9 y el día 11 postparto respectivamente, 2 horas después de cerrar el nido, se sacrificaron 24 gazapos (12 animales/día) considerados como controles. A su vez, los días 9, 10 Y 11 post-parto se sacrificaron gazapos tras 2, 24 Y 48 horas de ayuno respectivamente, a razón de 12 animales por día.

Muestreo

Todos los gazapos se pesaron antes del sacrificio que se realizo mediante dislocación cervical. Inmediatamente después y tras la apertura de la cavidad abdominal se peso el aparato digestivo completo, el estomago lleno y vacío, su contenido, y el intestino delgado y grueso llenos. Se tomaron dos porciones de la parte central del yeyuno. Una se congelo a -20°C para determinar mas tarde la actividad enzimática. La otra se aclaro con una solución de KCl 0.4 M y se conserve en una solución neutra buffer 10% de formaldehído (pH 7.2-7.4) para realizar el estudio histológico.

Histología

Cada porción de yeyuno se deshidrato gradualmente con una concentración creciente de alcohol etílico (50-100%). Posteriormente se fijo en parafina, se corto en secciones de 6 mm y se utilizo la hematoxilina-eosina como método de tinción. Una vez fijadas las muestras en portaobjetos se determino la longitud de las vellosidades intestinales mediante microscopia óptica, realizando 30 medidas en al menos tres cortes transversales independientes (10 medidas por corte) para cada una de las muestras de yeyuno obtenidas por animal (Hampson, 1986). Para realizar estas medidas se utilizo la aplicación informática NIH Image (desarrollada por el US National Institutes of Health que se encuentra disponible en Internet en la dirección <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>).

Ensayo enzimático

Para determinar la actividad de la lactasa intestinal, una vez descongeladas, las muestras se diluyeron con agua destilada (1120 peso/volumen). Tras un proceso de homogeneización durante 30 segundos en un homogeneizador polytron (Modelo RE 16, Janke & Kunkel, I KALaborstechnik) se analizo la actividad lactásica (EC 3.2.1.23) usando lactosa como sustrato. La glucosa liberada, a 37°C durante 30 minutos, a partir de la disacaridasa presente en las muestras se midió por el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa (Dahlquist, 1964).

Asimismo se tomaron alícuotas del yeyuno homogeneizado para la determinación de la concentración de proteína con un kit comercial (SIGMA Procedure No. P-5656) basado en la técnica de Lowry modificada por Peterson (1977).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento general de modelos lineales (GLM) del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Los principales efectos estudiados fueron la edad y el tiempo de ayuno. Todos los parámetros digestivos fueron referidos al peso vivo del animal y se considero la camada como efecto bloque. Los datos se presentan en tablas como medias corregidas por mínimos cuadrados.

Resultados

Al estudiar el efecto de la duración del ayuno sobre gazapos de 9, 10 y 11 días de edad se obtuvieron los resultados que se muestran en las tablas 1 y 2. Todos los gazapos de las camadas separadas de la madre sobrevivieron. El peso vivo de los gazapos de 9 días de edad, dos horas después de mamar fue de 164 ± 28.6 g, observándose una tendencia ($P=0.098$) a la disminución de dicho peso tras 24 y 48 horas de ayuno.

El peso relativo del tracto digestivo completo, del contenido del estomago y del estomago vacío fue inferior a las 24 horas de ayuno, mientras que el peso del intestino grueso aumento ($P<0.05$). Estas diferencias se mantuvieron tras 48 horas de ayuno en todos los parámetros anteriores, excepto en el peso relativo del estomago vacío. En cuanto al intestino delgado, su peso relativo se redujo tras 48 horas de ayuno ($P<0.05$).

Un ayuno de 24 horas no afecto a la longitud media de las vellosidades intestinales, sin embargo, tras 48 horas de ayuno se observo un acortamiento ($P<0.05$) de un 13%.

La cantidad de glucosa liberada por gramo de tejido obtenida se mantuvo en valores similares tras 24 horas de ayuno, mientras que a las 48 horas experimento un incremento ($P<0.05$). La concentración de proteína determinada por gramo de tejido descendió ($P=0.05$) tras 24 horas, tendencia que se mantuvo en las siguientes horas de ayuno, aunque sin llegar a encontrar diferencias significativas. La actividad específica de la lactasa (μmol de glucosa/g de proteína) aumento ($P<0.05$) con el ayuno.

Al comparar animales de 9 y 11 días de edad que no habían sido separados transitoriamente de la madre (grupo control), con animales que habían ayunado durante 48 horas, se obtuvieron los resultados que se muestran en las tablas 3 y 4.

En los animales control de 11 días de edad el peso vivo aumento ($P<0.05$) con respecto a conejos de 9 días controles y de 11 días ayunados, 201:t28, 164:t29 y 137:t26, respectivamente. En los parámetros digestivos medidos, al estudiar animales de 9 y 11 días con lactación interrumpida no se encontraron diferencias significativas, salvo en el peso del intestino grueso. Pero al comparar animales de 9 días con animales de 11 que estuvieron sometidos a un ayuno de 48 horas, los pesos relativos de todos los parámetros digestivos estudiados, excepto el del estomago vacío y del intestino grueso, descendieron ($P<0.05$).

No se encontraron diferencias significativas en la longitud de las vellosidades intestinales entre los controles, mientras que entre los ayunados y controles de la misma edad se observo un acortamiento ($P<0.05$) de un 20%.

Se observa un aumento ($P<0.05$) medio de un 27% en la cantidad de glucosa liberada por gramo de tejido determinada en el yeyuno de animales de 11 días de edad que habían o no sufrido ayuno. La concentración de proteína por gramo de tejido evoluciona descendiendo ($P<0.05$) un 17% en ayunados y aumentando ($P<0.05$) un 14% en no ayunados. La actividad específica lactásica (μmol gluc/g de proteína) solo aumento en animales ayunados.

Discusión

El peso vivo de los gazapos de 9 días de edad (164:t29 g) es similar al encontrado por diversos autores en animales de la misma edad (Ubilla y col., 2000b, Yu Y Chiou 1997). La separación transitoria coneja-camada durante 48 horas determina la perdida de solo un amamantamiento. Como ya se observo en trabajos previos (Ubilla y col. 2000b), no existe un incremento de mortalidad durante la separación, ya que posiblemente el alimento almacenado permite la supervivencia del animal durante este periodo. Según Gilge y Hudson (2001), los gazapos de pocos días de edad soportan ayunos de 48 horas y de hasta 72 horas en fases mas avanzadas de lactación.

El peso relativo del tracto digestivo completo supone mas del 17% del peso vivo del animal 2 horas después de la ultima ingestión de leche, tanto a 9 como a 11 días, lo cual pone de manifiesto la

capacidad de los gazapos para ingerir cantidades de leche en cada amamantamiento que pueden llegar a ser hasta de un 25% de su peso vivo (Jilge y Hudson 2001). El estado de repleción permanente del estomago en gazapos en lactación interrumpida explicaría la elevada proporción que representa el peso de este órgano con respecto al resto del tubo digestivo en el gazapo lactante (Lebas y Laplace, 1972). Sin embargo, tras 24 y 48 horas de ayuno solo quedan restos de leche mezclados con secreciones gástricas, de modo que la pérdida de peso del gazapo podría ser debida solo a la reducción del peso del contenido del estomago. No encontramos explicación biológica en 10 referente al descenso del peso relativo del estomago vado cuando el animal esta 24 horas sin comer.

Tras 24 horas de ayuno el peso relativo del intestino delgado no experimenta variaciones, probablemente debido al propio tránsito del contenido digestivo procedente del estomago. Sin embargo, tras 48 horas la falta de alimento y por tanto de tránsito, pudo provocar un vaciado de dicho tramo que se tradujo en un menor peso del mismo. A pesar del ayuno, el peso relativo del intestino grueso siguió aumentando. La dificultad en el vaciado de este compartimiento no nos permite afirmar que el incremento de peso observado se deba al contenido del mismo o a la alta tasa de crecimiento de estos tramos en animales recién nacidos (Lebas y Laplace, 1978; Yu Y Chiou, 1997).

La morfología de las vellosidades de la mucosa yeyunal observadas en este trabajo fue estrecha y alargada, similar a la observada por Yu y Chiou (1997) en el mismo periodo. Como se ha observado en otras especies, uno de los más potentes estímulos de la proliferación celular del intestino es la presencia de alimento en su interior o más específicamente, el flujo de nutrientes a través del intestino delgado (Diamond y Karasov, 1983). El descenso de la longitud de las vellosidades observado en este trabajo tras 48 horas de ayuno ha sido explicado en otras especies por la ausencia de nutrientes procedentes de la luz del intestino (por destete u otras causas de ayuno), ya que la ingesta oral de alimento y su presencia física en el tracto gastrointestinal *per se*, son necesarias para el mantenimiento estructural y funcional de la mucosa intestinal (Pluske, 1997).

La ingestión de leche esta asociada no solo con el crecimiento, sino también con el perfecto funcionamiento de los sistemas responsables de la digestión de los nutrientes y por tanto de la actividad enzimática (Sangild y col., 2000). Debido a la distribución más apical de la actividad lactásica a lo largo del villi cabría esperar una reducción de la misma por el acortamiento de las vellosidades (Marounek y col. 1995; Tsuboi Y col. 1981 y 1985). Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la actividad lactásica al expresarla como glucosa liberada por gramo de yeyuno aumenta. Este incremento podría ser consecuencia del ritmo circadiano que regula la síntesis de enzimas digestivos, al igual que otras funciones fisiológicas (ingestion de alimentos, agua, cecotrofia, excreción de orina y heces) (Hornicke y col. 1984).

Según Jilge y Hudson (2001), el balance energético de los gazapos lactantes parece que se mantiene debido al uso escalonado de los nutrientes almacenados en cada lactación. Primero utilizaría la glucosa de la leche, pero cuando no tiene acceso a ella, recurriría a las reservas de glucógeno y a la gluconeogénesis a partir de proteínas circulantes, disminuyendo su disponibilidad para la regeneración y mantenimiento a nivel celular de la mucosa intestinal. Probablemente, debido al aumento de glucosa liberada y al descenso de proteína, la actividad lactásica específica (relación glucosa proteína) aumenta.

Como conclusiones se puede decir que una separación transitoria coneja-camada con el objeto de incrementar la actividad ovárica de la coneja tiene las siguientes consecuencias:

1. La pérdida de peso del gazapo y de pesos relativos de los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal tras 48 horas de ayuno podría ser debido a la ausencia de ingestión de leche y a la pérdida de contenido del estómago, mas que a retrasos del crecimiento.
2. La ausencia física de nutrientes puede alterar o disminuir la longitud de las vellosidades intestinales.
3. El aumento de la actividad lactásica específica podría ser debido a la disminución en la cantidad de proteína presente por gramo de mucosa intestinal.

Ante los resultados obtenidos en este trabajo, es necesario estudiar que efecto tienen los cambios originados por el ayuno en edades mas avanzadas del gazapo y su posible recuperación, permitiéndoles obtener resultados productivos en cebo compatibles con los que tienen animales que no han sido sometidos a ayuno.

Tabla 1. Pesos relativos de diferentes segmentos del tracto digestivo (referidos al peso vivo) en gazapos sacrificados después de 2, 24 y 48 horas de ayuno.

Variables (%)	Tiempo de ayuno			EEM	P
	2 horas	24 horas	48 horas		
Pdig ^a , %pV	17.8 ^a	7.87 ^b	7.12 ^b	0.348	0.0001
Pestv ^d , %pV	1.72 ^a	1.49 ^b	1.74 ^a	0.027	0.0007
Pconest ^e , %pV	12.0 ^a	2.08 ^b	1.51 ^b	0.320	0.0001
Pintd ^f , %pV	2.97 ^a	2.86 ^a	2.40 ^b	0.055	0.0004
Pintg ^g , %pV	1.15 ^a	1.42 ^b	1.46 ^b	0.029	0.0001
Pvsacrificio	164	150	137	4.85	0.0988

Las medias seguidas de letras diferentes son estadísticamente distintas.

EEM: Error estándar de las medias (n=36). Pdig: peso del tracto gastrointestinal completo. Pestv: peso del estómago vacío. Pconest: peso del contenido del estómago. Pintd: peso del intestino delgado. Pintg: peso del intestino grueso. Pvsacrificio: peso vivo al sacrificio.

Tabla 2. Glucosa (μ mol liberados por g de tejido en 30 minutos a 37°C), concentración de proteína (μ g por mg de tejido) y actividad específica de la lactasa (μ mol glucosa/g de proteína) en la porción media del yeyuno; longitud de las vellosidades intestinales en gazapos sacrificados después de 2, 24 y 48 horas de ayuno.

Variables	Tiempo de ayuno			EEM	P
	2 horas	24 horas	48 horas		
Glucosa	100 ^a	107 ^a	131 ^b	3.51	0.0028
Proteína	97.0 ^a	86.1 ^b	80.0 ^b	2.82	0.0500
Act. Esp.	1047 ^a	1263 ^b	1675 ^c	39.3	0.0001
Long. Villi, μ m	665 ^a	708 ^a	579 ^b	18.7	0.0422

Las medias seguidas de letras diferentes son estadísticamente distintas.

EEM: Error estándar de las medias (n=34), para los parámetros enzimáticos.

EEM: Error estándar de las medias (n=26), para la longitud de las vellosidades. Long. villi: longitud de los villi.

Tabla 3. Efecto de 48 horas de ayuno sobre los pesos relativos de diferentes segmentos del tracto digestivo (referidos al peso vivo) en gazapos de 9 y 11 días de edad.

Variables (%)	9 Control	11 Control	11 Ayunados	EEM ^a	P
Pdig ^b , %pV	17.8 ^a	18.6 ^a	7.12 ^b	0.422	0.0001
Pestv ^d , %pV	1.72 ^a	1.64 ^a	1.74 ^a	0.029	NS
Pconest ^e , %pV	12.0 ^a	12.0 ^a	1.51 ^b	0.399	0.0001
Pintd ^f , %pV	2.97 ^a	2.73 ^a	2.40 ^b	0.055	0.0008
Pintg ^g , %pV	1.15 ^a	1.35 ^b	1.46 ^b	0.027	0.0004
Pvsacrificio	164 ^a	201 ^b	137 ^a	4.580	0.0001

Las medias seguidas de letras diferentes son estadísticamente distintas.

EEM: Error estándar de las medias (n=36). Pdig: peso del tracto gastrointestinal completo. Pestv: peso del estómago vacío. Pconest: peso del contenido del estómago. Pintd: peso del intestino delgado. Pintg: peso del intestino grueso. Pvsacrificio: peso vivo al sacrificio.

Tabla 4. Efecto de un ayuno de 48 horas sobre la glucosa (μmol liberados por g de tejido en 30 minutos a 37°C), la concentración de proteína (μg por mg de tejido) y la actividad específica de la lactasa (μmol glucosa/g de proteína), la morfología de la mucosa del yeyuno en gazapos de 9 y 11 días de edad.

Variables (%)	9 Control	11 Control	11 Ayunados	EEM ^a	P
Glucosa	100 ^a	123 ^b	131 ^b	3.51	0.0153
Proteína	97.0 ^a	111 ^b	80.0 ^c	2.82	0.0001
Act. Esp.	1047 ^a	1137 ^a	1675 ^b	39.3	0.0001
Long.villi, μm	665 ^a	579 ^b	727 ^a	15.3	0.0035

Las medias seguidas de letras diferentes son estadísticamente distintas.

EEM: Error estándar de las medias (n=35), para los parámetros enzimáticos.

EEM: Error estándar de las medias (n=31) para la longitud de las vellosidades. Long. villi: longitud de los villi.