EFECTO DEL TIPO DE FIBRA SOBRE EL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A INTESTINO EN GAZAPOS DE 35 DÍAS DE EDAD

Gómez-Conde M.S.[1], Chamorro S.[1], Rebollar P.G.[1], Eiras P.[2], García J.[1], Carabaño R.[1]

[1]Dpto. Producción Animal. ETSI Agrónomos. UPM. Madrid 28040
[2] Servicio de Inmunología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal es fundamental no sólo para el perfecto desarrollo de las distintas funciones intestinales, sino también como barrera de protección frente a la colonización por agentes patógenos. La dieta puede afectar a las características de la mucosa intestinal. En este sentido, trabajos previos en conejos alimentados con distintos tipos de fibra han puesto de manifiesto como la inclusión de fibras más solubles, producen un alargamiento en la longitud de los villi y una mejora en la actividad de los enterocitos; mientras que la inclusión de fibras más lignificadas da lugar a una atrofia estructural y a una menor actividad de las células intestinales (Chiou et al., 1994; Gómez-Conde M.S. et al., 2004; García et al., 1997). Un daño en la mucosa intestinal puede afectar a la respuesta inmune, pudiendo resultar este efecto aún mayor en el caso de animales jóvenes, en los que ya se ha observado (Lanning et al., 2000 y Campin et al., 2003) como el sistema inmune asociado a mucosa no se encuentra totalmente desarrollado. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del tipo de fibra sobre la población linfocitaria de la lámina propia intestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Piensos. Para estudiar el efecto de dieta sobre la regulación de la respuesta inmune, se formularon tres dietas isoenergéticas, isoproteicas, con el mismo contenido en almidón y fibra total, pero en las que se fue modificando la relación entre el porcentaje de fibra soluble respecto a la insoluble, utilizando como principales fuentes de fibra: cascarilla de avena, heno de alfalfa y una mezcla de pulpa de remolacha y pulpa de manzana. Los ingredientes y la composición química se recogen en la tabla 1. El acceso de los animales al pienso fue a voluntad y se les suministró 200 ppm de sulfato de apramicina y 120 ppm de tilosina tartrato en el agua de bebida.

Tabla1. Ingredientes y composición química de los piensos experimentales

Dietas	Cascarilla de avena	Alfalfa	Pulpas
Ingrediente, %			
Heno de alfalfa	13.9	28.3	13.9
Cascarilla de avena	14.7	0	0
Pulpa de remolacha	0	2.3	15.0
Pulpa de manzana	0	0	5.0
Composición química, %MS (Valor determinado)			
Almidón [2]	20.8	21.1	20.5
FND [2]	35.8	33.5	33.1
Fibra soluble[1]	7.9	10.3	13.1
ED kcal/kg MS	2965	3008	3121

Ingredientes comunes: Trigo cocido: 32.3%, Salvado:8.4%, Girasol 36: 7.1%, Soja 44: 11.1%
[1]Valor calculado a través del análisis de las materias primas mediante el métodos de Hall (1998)
[2]Valor determinado de acuerdo con los procedimientos de la AOAC (1995) y Van Soest (1991)

Animales. Se empleó un total de 36 animales (12 por tratamiento) de la raza Blanco Neozelandés×Californiano, destetados con 25 días de edad y un peso medio de 524±110 (desv. std.) gramos. Los animales fueron asignados a las tres dietas sin realizar distinción entre sexos y utilizando la camada como bloque. A los 35 días de edad y un peso medio de 964±155, se procedió al sacrificio de los animales mediante la administración endovenosa de barbitúricos (pentobarbital sódico, Dolethal).

Técnicas analíticas. El aislamiento de linfocitos en lámina propia se realizó conforme al procedimiento descrito por Eiras et al. (1998). Para lo cual, se tomó una muestra de duodeno de 1 mm de longitud, situada inmediatamente después de la primera flexura duodenal. Dicha muestra se abrió longitudinalmente y se incubó durante 45 minutos en un medio de cultivo que contenía 5 ml de una solución de RPMI/Suero de ternera fetal al 10% y 50 μl de colagenasa (1.5mg/ml). La cantidad de linfocitos en Lámina propia (LPL), su caracterización fenotípica (CD45: marcador general de linfocitos, CD5: marcador de linfocitos T, CD4: marcador de Linfocitos T cooperadores, CD8: marcador de linfocitos T citotóxicos), así como el estado de activación de los mismos (CD25: receptor de la interleukina2) se realizó incubando las muestras con los correspondientes anticuerpos monoclonales (Cymbus Biotechnology). El análisis de datos se realizó mediante citometría de flujo tricolor en FACScan estándar (Becton Dickinson).

Análisis estadístico. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). El efecto principal estudiado fue la fuente de fibra, introduciendo la camada como bloque y el peso al destete como covariable. La comparación entre medias se realizó mediante un test LSD protegido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se muestran los resultados del efecto del tipo de fibra sobre la cantidad de linfocitos de la lámina propia y la distribución fenotípica en gazapos de 35 días de edad. No se observó ningún efecto significativo del tratamiento sobre el porcentaje total de linfocitos, resultando además este valor marcadamente superior a los medidos en trabajos previos (Campín et al., 2003).

Tabla 2. Efecto del tipo de fibra sobre la cantidad de linfocitos de la lámina propia (LPL) y la distribución fenotípica (% sobre total linfocitos) presentes en duodeno

	Casc. Avena	Heno de alfalfa	Pulpas	EEM[1]	P
%Linfocitos	8.69	5.14	4.83	1.95	0.3547
CD5+ (linfocitos T)	76.76	74.17	75.88	3.80	0.8952
CD5- (linfocitos B)	23.24	25.83	24.12	3.80	0.8952
CD25+	11.17[b]	19.05[a]	14.84[a]	1.85	0.0290
CD5+CD25+	8.36	15.29	11.57	1.84	0.0572
CD4+	26.25	33.95	35.06	3.87	0.2546
CD8+	30.32	26.88	21.34	2.61	0.0743
CD4+CD8+	25.05	22.49	23.68	3.39	0.8718

[1]n=12

El porcentaje total de linfocitos que expresó el marcador de superficie CD5+, así como el que no lo expresó CD5-, no se vio afectado por el tipo de pienso, resultando como media del 75.6% y 24.4%, respectivamente. De estos resultados se comprueba, al igual que ya se observó en trabajos previos (Campín et al., 2003) como los animales a 35 días no presentan un sistema inmune desarrollado, predominando el porcentaje de linfocitos T sobre el de linfocitos B y natural killer.

Al estudiar el grado de activación de estos linfocitos mediante la expresión del marcador de superficie CD25, los animales que ingirieron los piensos con un menor contenido en fibra soluble presentaron una menor activación linfocitaria. Tanto la proporción de linfocitos totales y de los linfocitos T CD25+ fue significativamente inferior en la dieta de cascarilla de avena respecto a las de pulpa y de alfalfa (11.17 *vs* 16.94, P=0.03 y 8.36 *vs* 13.43, P=0.057, respectivamente).

En este experimento, el hecho de que en los animales que consumieron el pienso con cascarilla de avena, se redujese el porcentaje de linfocitos CD25+ (receptores de la IL-2), al mismo tiempo que el porcentaje de linfocitos CD8+ tendiese a aumentar, podría estar poniendo de manifiesto una respuesta inmune de tipo celular producida por un antígeno de tipo endógeno o por la translocación de una toxina capaz de atravesar la mucosa intestinal. En este sentido, en trabajos previos (Gómez-Conde, 2004), ya se ha observado como dietas con cascarilla de avena ejercen un efecto negativo sobre la mucosa intestinal, reflejado por un acortamiento en la longitud de los villi y probablemente por un incremento en la permeabilidad de la membrana que podría estar favoreciendo la translocación directa de toxinas.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC, 1995, Asociation of Official Analitycal Chemists, Arlington, V.A.

Eiras P.; Roldán E., Camarero C., Olivares F., Bootello A. and Roy G. (1998). Citometry (Communications in Clinical Cytometry) 34, 95-102.

Campín J., Eiras P., Rebollar P.G., Carabaño R. (2003). Estudio del tejido linfoide asociado a intestino en gazapos en torno al destete. ITEA 24: 660-662.

Chiou, P.W.S., Yu, B., Lin, C. (1994). Effect of different components of dietary fiber on intestinal morphology of domestic rabbits. Comp. Biochem Physiol. 108A: 262-638.

García, A.I., García, J., de Blas, J.C, Piquer, J., Carabaño, R. (1997). Efecto de la fuente de fibra sobre la actividad enzimática de la amilasa pancreática y las sacarasas en yeyuno e ileon. ITEA 18: 187-189.

Gómez-Conde, M.S., Chamorro, S., Nicodemus, N., De Blas, C., García, J. y Carabaño. R. (2004). Efecto del tipo de fibra en la alimentación de gazapos destetados precozmente. XXIX Congreso ASESCU. 157-163.

Hall, M.B., Pell, A.N., Chase, L.E. (1998). Characteristics of neutral detergent-soluble fibre fermentation by mixed ruminal microbes. Anim. Feed Sci. Technol.70: 23-39.

Lanning D., Sethupathi P., Rhee K.J, Zhai S.k and Knight K.L. (2000). Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. Journal of Immunology, 165 (4), 2012-2019.

SAS. 1990. SAS/STAT ® User's Guide (Version 6, fourth Edition): SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Van Soest, J.P., Robertson, B. A., Lewis. (1991): Method for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.