

## **Estimación de la ingestión de heces blandas a partir de la excreción urinaria de derivados púricos en conejos.**

**J. M. Ganuza, J. Balcells, S. M. Martín-Orúe y J. F. Pérez.**

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos.

Facultad de Veterinaria. Miguel Servet 177 - 50013 Zaragoza.

### **Introducción.**

Los rumiantes son capaces de aprovechar la proteína microbiana resultante de los procesos de fermentación que se desarrollan en el retículo rumen. En los animales herbívoros-monogástricos, este compartimento de fermentación se sitúa en ciego y colon y por tanto es desperdiciado con las heces, sin embargo algunas especies han desarrollado mecanismos especiales para aprovechar este material que combinan la retención selectiva, de líquido y partículas de pequeño tamaño en el ciego, con ciertas formas de coprofagia. Estos mecanismos se definen como cecotrofia y transforman el ciego de los lagomorfos en una cámara de fermentación, susceptible de ser manipulada con el fin de minimizar el aporte de proteína dietética. La producción y utilización de heces blandas se determina mediante la utilización de collares que previenen la ingestión de cecotrofos, sin embargo constituyen un elemento distorsionador, dado que la propia cecotrofia forma parte de la fisiología digestiva del conejo (Cheecke col., 1987).

El flujo duodenal de bases púricas (BP) puede ser estimado a partir de la excreción renal de sus derivados metabólicos una vez establecido un modelo de respuesta entre la excreción urinaria y la absorción duodenal de purinas. Esta técnica se aplica de forma rutinaria en ovejas (Balcells y col., 1993), cabras (Lindberg y col., 1989) y vacas (Verbic y col., 1990) para estimar el flujo duodenal de purinas como un índice del flujo de N microbiano sintetizado en el rumen. En el conejo, el exceso de bases púricas en el quimo, respecto a aquellas absorbidas en la dieta, debe proceder de la ingestión de proteína microbiana o de cecotrofos. En el presente trabajo se trató de establecer el modelo e respuesta a partir de: i) la recuperación urinaria de la purinas duodenales y ii) la contribución endógena a dicha excreción.

## **Material y Métodos.**

### *Animales y dietas:*

*Experimento 1:* Se utilizaron 7 conejos machos de raza Neozelandesa con un peso medio inicial de  $2,0 \pm 0,18$  kg. Los animales fueron mantenidos con collares de madera (5 cm d.i. y 27 d.e.) para evitar la cecotrofia y alojados en jaulas metabólicas que permitían el control individual de ingesta y excretas. Se elaboraron cinco dietas experimentales formuladas en base a (% de materia seca): heno de prado (50 %) cebada grano (40 %) y caseína (7,5-6,0 %) suplementadas con diferentes cantidades de ARN de levadura (g/kg MS): 0 g, dieta A; 3,75 g, B; 7,50 g, C; 11,25 g, D y 15,00 g, E, respectivamente. Las dietas fueron suministradas en un diseño en bloque incompleto (Cuadrados de Youden) donde los cinco tratamientos (o dietas) fueron probados con 7 animales durante 7 periodos. La raciones fueron suministradas una vez al día y a nivel restringido (50 g/kg PV) para evitar la existencia de rehusos. Cada periodo experimental tuvo una duración de 8 días que consistieron en cinco días de adaptación seguidos por tres días de recolección de heces y orina.

Una vez finalizado el experimento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, el ciego fue extraído y el contenido cecal utilizado para la extracción bacteriana.

*Experimento 2:* Se utilizaron seis machos de raza neozelandesa con un peso vivo de  $3,0 \pm 0,24$  kg y se mantuvieron en las mismas condiciones que el Experimento 1 pero en este caso se les administró una dieta semisintética exenta de BP formulada en base a (% de materia seca): 55 % de paja lavada, 30 % de almidón, 13 % de caseína y 2 % de un mezcal de vitaminas y minerales. La alimentación con la dieta exenta de bases púricas se mantuvo durante 8 días y se colectó la orina durante los tres últimos.

### *Tratamiento de las muestras y análisis químicos:*

La orina fue recogida diariamente utilizando ácido sulfúrico (20 ml 0,1 M) como conservante. En orina, la determinación de derivados púricos (DP) se realizó en la fase líquida y en el precipitado mineral tras su redilución con 100 ml de tampón glicerol-fosfato (10 %, pH 9), en ambos casos los derivados púricos fueron analizados

por HPLC siguiendo la técnica propuesta por Balcells y col. (1992). Adenina y Guanina en los alimentos heces y bacterias cecales, fueron analizados con la misma técnica tras su hidrólisis con PCA (Martín Orúe y col., 1995).

Para la extracción de bacterias, el contenido cecal se diluyó con una solución de carboximetil celulosa (CMC) en solución salina (0,9 % NaCl, CMC 0,1 %) y se incubó durante 15 min a 38 °C para enfriarla posteriormente a 4 °C durante 24 h según el método propuesto por Minato y Sutto (1978). La solución de contenido cecal se filtró a través de ocho capas de gasa y las bacterias se separaron del sobrenadante por centrifugación diferencial consistente en una primera centrifugación a 500 x g durante 5 min, para precipitar residuos de alimentos, seguida de una segunda centrifugación del sobrenadante a 20 000 x g durante 20 min para precipitar las bacterias de las muestras.

#### *Análisis estadístico.*

Los resultados se analizaron como un cuadrado latino incompleto donde los cinco tratamientos se probaron con los siete animales durante siete periodos experimentales. El análisis se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Box y col. (1978). La significación de los componentes lineal o cuadrático de la respuesta se estudió mediante la partición de la suma de cuadrados siguiendo el procedimiento de los polinomios ortogonales descrito por Steel y Torrie (1980).

#### **Resultados y Discusión.**

Dado que en el presente experimento la ingestión de materia seca fue restringida, los animales presentaron ritmos de crecimiento moderados (16 g/d) que no fueron diferentes entre tratamientos ( $p > 0,1$ ). La digestibilidad media de las dietas se situó entorno al 55 % y la excreción de cecotrofos representó el 21 % de la excreción fecal total de materia seca. La excreción de derivados púricos respondió rápidamente a las variaciones en el nivel de bases púricas ingeridas (Tabla 1), estando la mayor proporción de este incremento explicado por la alantoína, que incrementó de 3,2 a 6,2 mmol/d ( $p < 0,001$ ). El ácido úrico incrementó también con el tratamiento experimental (0,31 a 0,60 mmol/d), de forma que la relación entre ambos compuestos fue prácticamente constante, representando la alantoína el 90 % de la excreción total de derivados púricos. La concentración de xantina e hipoxantina en las muestras de

orina fue prácticamente despreciable.

La excreción de creatinina en orina ( $1,36 \pm 0,097$  mmol/kg  $PV^{0,75}$ ) no fue modificada por el tratamiento experimental, de forma que la relación alantoína/creatinina en las muestras de orina incrementó de 1,19 a 2,50 ( $p < 0,001$ ).

En la Tabla 2 se presenta la excreción urinaria de derivados púricos en animales recibiendo una ración exenta de bases púricas, dichos niveles son definidos en la presente memoria como excreción endógena. Cuando los animales ingirieron la dieta semisintética, exenta de bases púricas, la excreción de alantoína descendió de  $1600 \pm 37,2$  a  $521 \pm 29,1$   $\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$  y la de ácido úrico de  $155 \pm 3,2$  a  $55,3 \pm 2,9$   $\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$ , no se apreciaron, al igual que en el experimento anterior, ni xantina ni hipoxantina. El valor medio para la excreción endógena para el total de DP fué de  $588 \pm 40,2$   $\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$ .

Los niveles de excreción endógena observados fueron similares a los registrados en bovino (514 - 680  $\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$ , Sibanda y col., 1982, Chen y col., 1990, Giesecke y col., 1993) aunque inferiores a los niveles de ovino (165 - 202  $\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$ , Giesecke y col., 1984, Fujihara y col., 1987, Chen y col., 1990, Balcells y col., 1991). En relación a otras especies de monogástricos, los niveles fueron superiores a los registrados en suidos (166 - 199  $\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$ , Chen y col., 1990, Martín Orúe y col., 1995) aunque inferiores a los valores determinados en ratas por Greife (1980) (990  $\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$ ). Sin duda diferencias en las concentraciones de los enzimas que intervienen en el metabolismo de las bases púricas (Chen y col., 1990) o en el propio "turnover" proteico pueden explicar estas diferencias.

La toma de muestras del contenido cecal se llevó a cabo a primera hora de la mañana cuando los animales aún no habían recibido la ración, en estas condiciones la concentración de amoníaco en el contenido cecal fue de 8,3 mg/100 ml, el pH mostró un valor medio de  $6,4 \pm 0,08$  y la concentración de AGV fue de  $72,5 \pm 3,21$  mmol/l constituidos en su mayor proporción por acético (80,5 %) seguido por el propiónico (9,4 %) y butírico (5,9 %). Las bacterias cecales mostraron un contenido de N de 66,4 g/kg MS y en bases púricas de 94,6 mmol/kg MS y la relación BP/N mostró un valor de 1,42 mmol/g.

En la Figura 1 se presenta la relación entre la excreción de derivados púricos (y, alantoína y ácido úrico) y el flujo duodenal o ingestión de bases púricas (x) y en ella se aprecia una estrecha correlación. Los resultados presentados anteriormente, se

ajustaron a la siguiente ecuación :

$$y = 0,588 (\pm 0,136) + 0,67 (\pm 0,018) x \quad R^2 = 0,868 \quad \text{RSD} = 0,338$$

expresadas tanto x como y en  $\mu\text{mol/Kg PV}^{0,75}$ . La inclusión de un componente no lineal en la modalidad del ajuste no mejoró la precisión del mismo. Ello indica que absorción y excreción urinaria de purinas presentaron un comportamiento lineal que implica que en esta especie, al igual que ha sido descrito previamente en otras (hombre, perro o bóvidos), el aporte endógeno es constante e independiente del aporte de bases púricas de origen exógeno. La tasa de recuperación de las bases púricas ingeridas (0,67) implica que aproximadamente un 80 % de las purinas absorbidas (asumiendo una digestibilidad de las BP en duodeno de 0,85) fueron recuperadas en la orina confirmando también en esta especie la existencia de vías de excreción alternativas a la renal (Balcells y col., 1991).

A partir de la ecuación propuesta en la Figura 1, se puede determinar el flujo duodenal de bases púricas que corresponden a la ingestión de bases púricas procedente de la dieta más aquellas de origen microbiano procedentes de los cecotrofos. Por tanto, la diferencia entre las bases púricas duodenales y las ingeridas con la dieta correspondería a las bases púricas de origen microbiano. En la medida que las bases púricas o los AN puedan ser utilizadas como marcadores microbianos (Smith y McAllan, 1974, Pérez y col., 1996), la ingestión de N microbiano (NMI) puede ser estimada a partir de la excreción urinaria de derivados púricos y el modelo queda resumido en la siguiente ecuación:  $\text{NMI (g/kg PV}^{0,75}) = 1,5 y_1 - 0,70 x_2 - 0,6$ ; en la que  $y_1$  son los derivados púricos excretados en orina ( $\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$ ) y  $x_2$  la ingestión de las bases púricas dietéticas ( $\text{g}/\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$ ).

Este trabajo ha sido financiado por Purina España.

## **Bibliografía.**

- Balcells, J., Guada, J. A., Castrillo, C. y Gasa, J. (1991). Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *J. Agric. Sci. Camb.* 116, 309-317.
- 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. *J. Chrom.* 575, 153-157.
- Balcells, J., Fondevila, M., Guada, J. A., Castrillo, C. y Surra, J. C. E. (1993). Urinary excretion of purine derivatives and nitrogen in sheep given straw supplemented with different sources of carbohydrates. *Anim. Prod.* 57, 287-292.
- Box, G. E. P., Hunter, W. G. y Hunter, J. S. (1978). *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building.* Ed. Wiley J. & sons. Inc. USA.
- Cheeecke, P. R. (1987). *Rabbit feeding and nutrition.* Academia Press Inc. Harcovot Brave Jovanovich, Publishers.
- Chen, X. B., Ørskov, E. R. y Hovell, F. D. DeB. (1990). Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion, differences between cattle and sheep. *Br. J. Nutr.* 63, 121-129.
- Fujihara, T., Ørskov, E. R., Reeds, P. J. Y Kyle, D. J. (1987). The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J. Agric.Sci. Camb.* 109, 7-12.
- Giesecke, D., Stangassinger, M. y Tiemeyer, W. (1984). Nucleic acid digestion and urinary purine metabolites in sheep nourished by intragastric infusion. *Can. J. Anim. Sci.* 64, 144-145.
- Greife, H. A. (1980). Nitrogen utilization of microbial nucleic acids in the growing rat. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> EAAP Symposium on Protein Metabolism and Nutrition held at Braunschweig, F. R. Germany May 1980. Eur. Assoc. Anim, Prod. Publ. 27 (1).

- Lindberg, J. E., Bristav, H. y Manyenga, A. R. (1989). Excretion of purines in the urine of sheep in relation to duodenal flow of microbial protein. *Swed. J. Agric. Res.* 19, 45-52.
- Martín Orúe, S. M., Balcells, J., Guada, J. A. y Castrillo, C. (1995). Endogenous purine and pyrimidine derivative excretion in pregnant sows. *Br. J. Nutr.* 73, 375-385.
- Minato, H. y Suto, T. (1978). Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem: II Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder in vitro and elution of bacteria attached therefrom. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24, 1-16.
- Pérez, J. F., Balcells, J., Guada, J. A. y Castrillo, C. (1996). Determination of rumen microbial-nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using  $^{15}\text{N}$  and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenum. *Br. J. Nutr.* 75, 699-709.
- Sibanda, S., Topps, J. H., Storm, E. y Ørskov, E. R. (1982). The excretion of allantoin by ruminants in relation to protein entering the abomasum. *Proc. Nutr. Soc.* 41, 75A.
- Smith, R. H. y McAllan, A. B. (1974). Some factors influencing the chemical composition of mixed rumen bacteria. *Br. J. Nutr.* 31, 27-34.
- Steel, R. G. D. y Torrie, J. H. (1980) *Principles and procedures of statistic*. McGraw-Hill Inc.
- Verbic, J., Chen, X. B., MacLeod, N. A. y Ørskov, E. R. (1990). Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *J. Agric. Sci., Camb.* 114, 243-248.

**Tabla 1:** Ingestión diaria de materia seca (MSI, g) bases púricas (BP, mmol/d) y excreción urinaria de alantoína, ácido úrico, derivados púricos totales y creatinina (mmol/d) en conejos machos de raza Neozelandesa recibiendo dietas formuladas en base a heno y cebada grano suplementadas con diferentes cantidades de ARN de levadura.

Dieta	A	B	C	D	E	SE	Sig. efecto	
							Lin	Quad
MSI (g/d)	135,2	135,7	137,8	134,0	135,8	3,19	NS	NS
BP (mmol/d)	2,32	4,70	6,50	8,48	10,3	0,301	***	***
<u>Excreción urinaria</u>								
Alantoína	3,18	4,17	5,31	6,10	6,21	0,217	***	***
Acido úrico	0,309	0,375	0,357	0,616	0,596	0,082	**	NS
DP totales	3,34	4,55	5,67	6,71	6,80	0,300	***	*
Creatinina	2,76	2,63	2,92	2,80	2,72	0,240	NS	NS
Alantoína/Creatinina	1,19	1,73	2,01	2,57	2,50	0,237	***	***

\* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; NS P > 0,1.

**Tabla 2.** Excreción de derivados púricos ( $\mu\text{mol/kg PV0,75}$ ) obtenidos en conejos en crecimiento no cecotrofágicos alimentados con una dieta semisintética libre de purinas.

Animal	Peso (kg)	Periodo (d)	Acido úrico	Alantoína	DP totales
1	2,74	5	38,34	419	458
2	2,78	5	40,91	558	599
4	2,99	6	43,11	488	531
5	2,96	6	75,03	627	703
6	3,24	5	79,43	620	699
7	2,86	6	54,88	483	538
Valor medio			$55 \pm 2,8$	$521 \pm 29,1$	$588 \pm 40,2$

**Figura 1.** Relación entre la excreción de derivados púricos (y, alantoína y ácido úrico,  $\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$ ) y el flujo duodenal o ingestión de bases púricas (x,  $\mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$ ).

