

Respuesta inmunitaria específica frente al pienso en gazapos

Cano J.L.1, Blas E.2, Soler M.D.1, Moya V.J.2, Guillén M.I.1

1 Departamento de Producción Animal y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Avda. de Seminario s/n, 46113-Moncada (Valencia)

2 Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Cno. de Vera 14, 46071-Valencia

Resumen

Se estudiaron 6 gazapos de una misma camada, que no tuvieron acceso al pienso hasta los 21 días de vida. A los 21 días de vida se identificaron, se les extrajo sangre y se les suministró ad libitum el pienso A hasta los 60 días de vida, momento en el que se les extrajo nuevamente una muestra de sangre. A la madre de los gazapos también se le tomaron muestras de sangre, en los mismos días que a los gazapos. La presencia de anticuerpos anti-pienso en suero sanguíneo se valoró mediante la técnica de dot-immunoblotting, utilizando como antígenos alimentarios las fracciones solubles de la digestión in vitro de los piensos A, B (formulado para que no incluyera ninguna de las materias primas contenidas en el pienso A) y N (pienso comercial consumido por la coneja). La coneja presentó una clara reactividad frente a todos los piensos testados, tanto en la muestra inicial como en la final. A los 21 días de vida, los sueros de los gazapos también mostraron una clara reactividad frente a todos los piensos testados, mientras que a los 60 días de vida los sueros de estos mismos animales presentaron una clara disminución de la concentración de anticuerpos frente a los piensos B y N, y un mantenimiento o, incluso, un aumento de los anticuerpos frente al pienso A. Los resultados del presente estudio indican la presencia de anticuerpos IgG anti-pienso en sangre de conejas adultas, así como su transmisión a la camada, y que los gazapos desarrollaron una respuesta inmunitaria específica propia hacia el pienso que consumieron en el periodo peridestete.

Abstract

In this study, six young rabbits, 21 days old and deprived of feed up till then, were used. Animals were identified and fed ad libitum on diet A throughout the experiment, until they were 60 days old. At the beginning and the end of experiment, samples of blood were taken from each animal, as well as from their mother. Dot-immunoblotting technique was carried out to assess the existence of anti-feed antibodies in blood serum, using soluble fractions from the in vitro digestion of diets A, B (formulated without including any raw material contained in diet A) and N (commercial diet consumed by the rabbit doe) as dietary antigens. The rabbit doe showed high reactivity against all tested diets, in both initial and final samples. The serum of 21 days old rabbits also showed high reactivity against all tested diets, whereas clear reduction of levels of antibodies against diets B and N, and maintenance or even increase of levels of antibodies against diet A were observed in serum of these animals when they were 60 days old. These results point to the existence of anti-feed IgG antibodies in blood of adult rabbit does, transferred to litter, as well as a specific immune response of young rabbits to the feed they consumed around weaning.

Introducción

El sistema inmunitario está diseñado para reaccionar frente a moléculas extrañas al organismo, que al no ser reconocidas como propias desencadenan una reacción defensiva. Los alimentos son una mezcla muy compleja de moléculas orgánicas ajenas al organismo y con una elevada capacidad de desencadenar reacciones inmunitarias. El sistema digestivo tiene la finalidad por una parte de digerir y absorber los nutrientes contenidos en el pienso, y por otra de identificar y neutralizar los agentes patógenos y dañinos que pueden penetrar vía intestinal. Para realizar estas dos funciones, en cierto modo antagónicas, el sistema inmunitario cuenta con una serie de complejos mecanismos de regulación de la respuesta inmunitaria intestinal local y sistémica para evitar reacciones adversas frente a los alimentos consumidos, lo que ocasionaría graves complicaciones para la salud y la supervivencia del individuo (Tizard, 2000).

Un primer mecanismo que impide la activación de reacciones inmunitarias frente a los alimentos es el propio proceso digestivo. Mediante la digestión se realiza una profunda hidrólisis de las moléculas complejas que componen los alimentos hasta moléculas muy sencillas, que son absorbidas por la mucosa intestinal. Estas moléculas resultantes del proceso de digestión no poseen capacidad de estimular el sistema inmunitario debido a su bajo peso molecular (Heyman, 2001).

Sin embargo, este mecanismo de protección inmunitaria se ve gravemente desafiado en el momento del destete, especialmente en destetes a temprana edad, cuando los gazapos no son capaces de digerir los alimentos de una forma eficiente. Esto implica la llegada a la mucosa intestinal de moléculas alimenticias de gran tamaño, potencialmente antigénicas, capaces de desencadenar fuertes reacciones inmunitarias (Kelly y Coutts, 2000). Esta situación se agrava cuando la dieta empleada en el destete no está diseñada teniendo en cuenta la fisiología digestiva de los gazapos en esta edad.

En la actual realidad de la producción cunícola intensiva, con una elevada mortalidad postdestete, el uso generalizado de piensos no especialmente formulados para animales digestivamente inmaduros supone un potencial riesgo inmuno-nutricional. Por ello resulta de especial interés estudiar si la llegada masiva de antígenos alimentarios a la mucosa intestinal de los gazapos puede inducir una reacción inmunitaria que se manifieste con la presencia en sangre de anticuerpos IgG específicos frente al pienso que están consumiendo.

Material y métodos

Se formularon dos piensos experimentales (A y B), diseñados de forma que sus proteínas procedieran de materias primas distintas y así conseguir una elevada divergencia antigénica (Tabla 1). También se utilizó un pienso comercial (N).

Se estudiaron 6 gazapos de una misma camada. Desde los 14 a los 21 días de vida, consumieron leche materna mediante lactación controlada y no tuvieron acceso al pienso. A los 21 días de vida se identificaron, se les extrajo sangre de la arteria central de la oreja (muestras 1 a 6 - ini) y se les suministró ad libitum el pienso A hasta los 60 días de vida, momento en el que se les extrajo nuevamente una muestra de sangre (muestras 1 a 6 - fin). La madre de los gazapos consumió pienso N durante toda la experiencia y se le tomaron muestras de sangre en los mismos días que a los gazapos (muestra 56-ini y muestra 56-fin).

Tabla 1. Ingredientes de los piensos experimentales (%)

	A	B
PULPA DE REMOLACHA	40	
TORTA DE SOJA	20	
CASCARILLA DE SOJA	20	
PAJA DE CEREAL	10	
ACEITE DE SOJA	7	
TRIGO		18.5
SALVADO DE TRIGO		18.5
ALFALFA HENIFICADA		55
HARINA DE PESCADO		5
DL-METIONINA	0.1	0.1
L-LISINA HCL	0.3	0.3
L-TREONINA	0.1	0.1
CARBONATO CÁLCICO	0.2	0.2
FOSFATO BICÁLCICO	1.2	1.2
SAL	0.6	0.6
CORRECTOR	0.5	0.5

Para estudiar la presencia de anticuerpos anti-pienso en suero sanguíneo se usó la técnica de dot-inmunoblotting. Los antígenos alimentarios se obtuvieron de la fracción soluble de la digestión péptica in vitro de los piensos A, B y N (Pascual et al., 2000). Como control de la técnica se utilizó el resultante del proceso de digestión sin muestra de pienso. Los antígenos se adsorbieron a una membrana de nitrocelulosa de forma secuencial:

- superior izquierda, pienso A, consumido por los gazapos desde los 21 días
- superior derecha, pienso B, con el que los gazapos no tuvieron nunca contacto;
- inferior izquierda, pienso N, pienso consumido por la madre
- inferior derecha, control de la técnica.

Se prepararon tantas membranas de nitrocelulosa como sueros a testar. Las membranas se bloquearon con

leche desnatada al 3% en tampón fosfato-salino 20 mM pH 7.0 (PBS) conteniendo 0.1% Tween-20, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, cada una de las membranas se incubó con uno de los sueros, diluidos 1/10 en PBS, durante 2 horas a 37 °C. Tras lavar exhaustivamente las membranas con PBS-Tween, se incubaron con anticuerpo anti-IgG de conejo obtenido en cabra marcado con peroxidasa. El complejo inmunitario formado se reveló con un substrato luminiscente con el que se impresionaron placas fotosensibles, que una vez procesadas muestran las diferentes áreas de reacción antígeno-anticuerpo. La intensidad de cada una de estas áreas es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG específicos unidos a los antígenos alimentarios del hidrolizado de pienso correspondiente.

Resultados y discusión

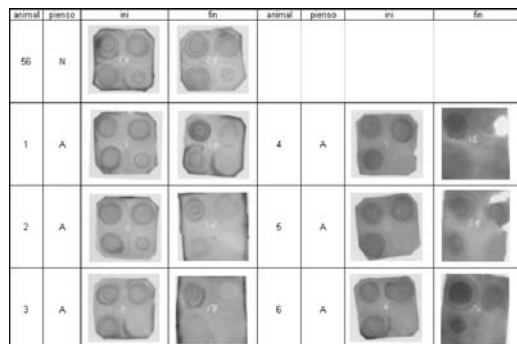
Como se observa en la Figura 1, la coneja presenta una clara reactividad frente a todos los piensos (A, B y N), tanto en la muestra inicial (56-ini) como en la muestra final (56-fin), indicativa de la presencia de anticuerpos circulantes IgG anti-pienso en cantidades apreciables y con capacidad de reaccionar frente a una gran variedad de antígenos alimentarios. Esto se podría explicar por tratarse de una coneja adulta alimentada con dietas comerciales formuladas con una gran variedad de materias primas, que han provocado una variada estimulación antigénica y, por tanto, la producción de anticuerpos frente a una amplia gama de antígenos alimentarios. La reacción frente al control, de menor intensidad, indica la presencia de anticuerpos con capacidad de reconocer epítomos de la pepsina bovina usada en la digestión in vitro de los piensos, siendo atribuible a posibles reacciones cruzadas menos específicas con anticuerpos producidos frente a otros antígenos.

En el momento inicial (21 días de vida), los sueros de los gazapos también muestran una clara reactividad frente a todos los piensos testados, lo que sugiere una elevada concentración de anticuerpos IgG anti-pienso en sangre. Debido a que se trata de animales muy jóvenes, con una limitada capacidad de reacción inmunitaria y que todavía no habían consumido pienso, la presencia de estos elevados niveles de anticuerpos anti-pienso en sangre se explicaría por transmisión maternal.

En el momento final (60 días de vida), los sueros de estos mismos animales muestran una clara disminución de la concentración de anticuerpos frente a los piensos B y N, y un mantenimiento o, incluso, un aumento de los anticuerpos frente al pienso A, que es el que consumieron durante el experimento. Esto indicaría la existencia de una reacción inmunitaria específica frente al pienso que consumen los gazapos, con el desarrollo de anticuerpos específicos tipo IgG circulantes en sangre frente a ciertos antígenos del mismo. La disminución de los anticuerpos frente a los otros piensos, B y N, indica la falta de estímulo antigénico frente a estos piensos y es congruente con la cinética temporal de desaparición de anticuerpos transmitidos vía maternal.

Es destacable que en dos gazapos (1 y 2) se observó la presencia de reacción frente al hidrolizado control en la muestra inicial y no en la muestra final, lo que apoyaría el carácter específico de la reacción frente a la pepsina bovina y su origen maternal.

Figura 1



Conclusiones

Los resultados del presente estudio indican la presencia de anticuerpos IgG anti-pienso en sangre de conejas adultas, así como su transmisión a la camada, lo que explicaría su presencia en gazapos lactantes estrictos y no al final del cebo. Especialmente sugestivo resulta el hecho de que los gazapos desarrollaron una respuesta inmunitaria específica propia frente al pienso que consumieron en el periodo peridestete. Dada la grave problemática digestiva en

la producción cunícola y teniendo en cuenta que estos fenómenos de reacción inmunitaria frente a antígenos de origen alimentario son responsables de problemas intestinales y productivos en lechones y prerrumiantes (Li et al., 1991), la investigación en el campo de la inmuno-nutrición de los gazapos podría ser de gran interés.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto AGL2002-03608) y la Agencia Valenciana de Ciencia y Tecnología (Proyecto CTIDIB/2002/347).

Bibliografía

- HEYMAN M. 2001. How dietary antigens access the mucosal immune system. *Proceedings of the Nutrition Society* 60, 419-426.
- KELLY D., COUTTS A.G. 2000. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proceedings of the Nutrition Society* 59, 177-185.
- LI D.F., NELSEN J.L., REDDY P.G., BLECHA F., KLEMM R., GOODBAND R.D. 1991. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science* 69, 4062-4069.
- PASCUAL J.J., FERNÁNDEZ-CARMONA J., FERNÁNDEZ C., DÍAZ J.R., GARCÉS C., RUBERT-ALEMÁN J., LLOPIS S., MUELAS R. 2000. Nutritive evaluation of rabbit diets by different in vitro digestibility methods. 7th World Rabbit Congress, Valencia, vol. C, 385-389.
- STOKES C.R., MILLER B.G., BAILEY M., WILSON A.D., BOURNE F.J. 1987. The immune response to dietary antigens and its influence on disease susceptibility in farm animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 17, 413-423.
- TIZARD I.R. 2000. *Veterinary Immunology*. Saunders, Philadelphia.