

ESTUDIO DEL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A INTESTINO EN GAZAPOS EN TORNO AL DESTETE.

Campín J¹; Eiras P²; Rebollar P.G¹; Carabaño R¹

¹Dpto. Producción Animal, ETSI Agrónomos, UPM, Madrid 28040.

²Servicio de Inmunología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

INTRODUCCIÓN

Para comprender la influencia de la nutrición sobre el sistema inmune y sus respuestas es de particular importancia el estudio del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal. En los escasos trabajos realizados en conejos se ha observado una influencia de la edad en el desarrollo de este tejido (Lanning *et al.*, 2000). En otras especies se ha puesto de manifiesto la importancia de la dieta en la modulación de la respuesta inmune (Goddeeris *et al.*, 2002). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la edad, el destete y del tipo de proteína en la dieta sobre la población linfocitaria de la lámina propia intestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Para estudiar la evolución del tejido linfoide con la edad, con el destete y el tipo de pienso se utilizaron un total de 72 gazapos. Se sacrificaron 12 animales lactantes por tratamiento a los 12, 19, 26 y 32 días de vida. Para estudiar el efecto del destete y del tipo de pienso se sacrificaron a los 32 días de vida dos grupos de 12 animales destetados a los 25 días que consumieron *ad libitum* los piensos experimentales.

Piensos. Para estudiar el efecto de la fuente de proteína se formularon dos piensos experimentales cuya principal fuente de proteína fuese torta de girasol o torta de soja48 y que cubriese las actuales recomendaciones en proteína total, nivel y tipo de fibra. La composición química y las materias primas de los piensos se muestran en las tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. Composición química de los piensos experimentales

Análisis químico	SOJA 48	GIR 36
PB g/kg MS	193	197
FND, g/kg MS	332	324
LAD, g/kg MS	49	50
ED ^a , MJ/kg MS	11,2	11,1
PD/ED ^a , g/MJ	11,8	11,7

^aValores calculados según FEDNA (1999).

Tabla 2. Ingredientes de los piensos experimentales, g/kg de pienso

Ingrediente	SOJA 48	GIR 36
Trigo	290	276
Manteca	10	12
Harina girasol 36	0	172
Harina soja 48	129	0
Salvado y tercerillas	172	197
Alfalfa henificada	270	291
Cascarilla girasol	70	23
Cascarilla soja	31	0
C. Vitamínico-mineral	11,2	17,8
Antibióticos ^a	5,0	5,0

^a 100 ppm de bacitracina de Zn y 60 ppm de apramicina sulfato.

Técnicas analíticas. Para la determinación de MS y PB se siguieron los procedimientos descritos por la AOAC (1990). Los análisis de fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD), se realizaron según el método descrito por Van Soest *et al.* (1991). Para aislar los linfocitos de la mucosa duodenal, se cortó un tramo de 0.5 cm abriéndose longitudinalmente. Cada muestra se trató según el procedimiento descrito por Eiras *et al.* (1998). Para la extracción de los linfocitos de la lámina propia (LPL) de la muestra se incubó en 3 ml de RPMI STF10 % con 1ml/ml de

colagenasa. La cantidad de LPL (CD45) y su caracterización fenotípica (CD4, CD8, CD5 y CD25) se determinaron incubando la muestra con los correspondientes anticuerpos monoclonales (Cymbus Biotechnology LTD). El recuento se realizó mediante citometría de flujo (Becton Dickinson).

Análisis estadístico. Para estudiar la evolución de las poblaciones linfocitarias se realizó un análisis de varianza utilizando el proc GLM (SAS 1990) donde el efecto principal fue la edad. Para el estudio del destete y del tipo de pienso se compararon animales lactantes de 26 y 32 días con animales de 32 días destetados a los 25 días que consumieron los dos piensos experimentales mediante el mismo procedimiento. Las medias fueron comparadas mediante un test LSD protegido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 3 se muestra el efecto de la edad sobre la cantidad de linfocitos de la lámina propia (LPL) y la distribución fenotípica en gazapos lactantes. Se observó un efecto significativo de la edad sobre la cantidad de linfocitos presentes en lámina propia. Los animales de 26 días presentaron el mayor número de LPL ($p < 0.015$). Este mayor número de linfocitos puede deberse a una respuesta rápida del tejido linfoide asociado a la mucosa a la entrada, a partir de los 18 días de edad, de antígenos procedentes del consumo de pienso y de la colonización microbiana (De Blas *et al.*, 1999). Según Okuyama *et al.* (1998), se observa una mayor translocación bacteriana a los nódulos linfoides mesentéricos, hígado y bazo en los gazapos alimentados con una dieta basada en productos lácteos que la observada en animales alimentados por la madre. Además, la presencia de contenido microbiano en el intestino es un factor primario de inducción en el desarrollo y diferenciación del tejido linfoide tanto en gazapos como en lechones (Lanning *et al.*, 2000; Pabst y Rothkötter, 1999). El número de LPL a 32 días de edad vuelve a niveles similares a los de 12 y 19 días. Este retroceso podría corresponder al establecimiento de una cierta tolerancia a los antígenos del pienso que ha estado ingiriendo en cantidades crecientes. Strobel y Mowat (1998), observan que este mecanismo de tolerancia se manifiesta en menos de 5 a 7 días después de su administración oral.

Tabla 3. Efecto de la edad sobre la cantidad de linfocitos de la lámina propia (LPL) y la distribución fenotípica (% sobre total linfocitos) presentes en duodeno de gazapos lactantes.

	12 días	19 días	26 días	32 días	EEM	P
LPL	0.66 ^{AB}	0.54 ^B	0.95 ^A	0.44 ^B	0.12	0.015
CD5+	66.8 ^A	64.0 ^{AB}	53.6 ^B	51.6 ^B	4.34	0.05
CD5-	33.2 ^A	35.9 ^{AB}	46.3 ^B	48.3 ^B	4.34	0.05
CD25+	27.8	28.5	34.1	24.8	4.87	0.651
CD5+ CD25+	17.0	19.2	15.5	9.7	3.45	0.381
CD4+	23.8	13.14	25.24	21.5	4.16	0.268
CD8+	16.3	14.27	10.43	19.9	2.94	0.130
CD4+ CD8+	8.9	3.16	3.31	4.6	1.66	0.052

Se observa un descenso con la edad en el número total de linfocitos T que expresan el marcador de superficie CD5 ($p < 0.05$), así como un ascenso en el número de los que no lo expresan y que correspondería con el número de células plasmáticas productoras de anticuerpos y natural killer ($p < 0.05$). Al determinar la expresión del marcador de superficie CD25, no se han observado cambios en el grado de activación de los linfocitos totales ni de los linfocitos T.

En cuanto a los linfocitos que expresan los fenotipos CD4+ o CD8+ tampoco se detectan cambios significativos en las edades estudiadas. En el caso de los linfocitos CD8+ de los animales lactantes de 32 días de edad la mitad de ellos presentaron porcentajes medios similares a los CD8+ que tiene un animal destetado (tabla 4) y la otra mitad a los que tiene un animal lactante de menor edad. Esto sugiere que la existencia de una mayor o menor cantidad de linfocitos CD8+ dependerá de la proporción de pienso/leche que haya

ingerido, la producción de leche de la madre, etc. En cuanto a la relación CD4:CD8 en gazapos lactantes es mayor que 1 independientemente de la edad. Aunque en los primeros días de vida se han descrito relaciones menores que 1 tanto en lechones como en cabras (Goddeeris *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 1996) esta relación en los gazapos estudiados tiende a ser mayor que 1 con la edad. Los linfocitos T con fenotipo inmaduro CD4+ y CD8+ muestran una ligera tendencia a disminuir con la edad ($p < 0.052$).

Los animales destetados a los 25 días de edad, e independientemente del tipo de dieta, presentaron un porcentaje de linfocitos totales, de linfocitos CD4+ CD8+ o indiferenciados y de linfocitos T activados superior a animales de la misma edad sin destetar. Esto podría indicar que el tejido linfoide asociado a la mucosa presenta un mayor desarrollo y activación en animales destetados que ha sido descrito en otras especies (Solano-Aguilar *et al.*, 2001). Al contrario de lo que se ha descrito en lechones con dietas basadas con torta de soja (Dréau *et al.*, 1995), la fuente de proteína vegetal utilizada en la dieta de los gazapos destetados no afectó a la respuesta inmunitaria. De acuerdo con Pathirana *et al.* (1981), la coneja es capaz de transmitir anticuerpos anti-soja a la descendencia que suprimirían una respuesta inmunitaria ante la presencia de este tipo de proteína en la dieta del gazapo.

Tabla 4. Efecto del destete y de la fuente de proteína vegetal sobre la cantidad de linfocitos de la lámina propia (LPL) y la distribución fenotípica (% sobre total de linfocitos) presentes en duodeno.

	Lactantes		Destetados 32 d		EEM	P
	26 días	32 días	Soja	Girasol		
LPL	0.95 ^A	0.44 ^B	0.94 ^A	1.18 ^A	0.13	0.0006
CD5+	53.6	51.6	62.8	61.0	4.28	0.144
CD5-	46.3	48.3	37.1	33.9	4.23	0.064
CD25+	34.1	24.8	26.8	24.5	3.61	0.213
CD5+ CD25+	15.5	9.7	17.4	17.4	2.77	0.078
CD4+	25.24	21.5	24.7	28.5	4.25	0.757
CD8+	10.43	19.9	13.0	18.9	2.85	0.074
CD4+ CD8+	3.31 ^A	4.6 ^A	12 ^B	13.1 ^B	1.28	0.0001

Estos resultados constituyen un punto de partida para el estudio de la respuesta inmune de la mucosa en gazapos y para identificar los factores que influyen la capacidad de respuesta ante el estrés y la exposición a antígenos que suceden con el destete. Sin embargo, sería necesario un mayor repertorio de marcadores para la mejor caracterización de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en el conejo.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis (14th Ed). Association of Official Analytical Chemists (Ed), Arlington, VA.
- Eiras P.; Roldán E.; Camarero C.; Olivares F.; Bootello A. and Roy G. (1998). Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) **34**, 95-102.
- De Blas C.; Gutierrez I.; Carabaño R. (1999). Avances en nutrición animal. FEDNA. Pp: 65-82.
- Dréau D.; Lalleès J.P.; Toullec R. y salmon H. (1995). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **47**, 69-79.
- Goddeeris B.M.; Boersma W.J.A.; Cox E.; Van der Stede Y.; Koenen M.E.; Mast J.; Van den Broeck W. (2002). En: Nutrition and Health of the gastrointestinal tract. *Wageningen Academic Publishers*, pp: 97-134.
- Lanning D.; Sethupathi P.; Rhee K.J.; Zhai S.K. y Knight K.L. (2000). *Journal of Immunology*, **165**, (4), 202-2019.
- Navarro J.A.; Seva J.; Caro M.R.; Sánchez J.; Gómez M.A.; Bernabé A. (1996). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **55**, 303-311.
- Okuyama H.; Urao M.; Drongowski R.A.; Coran A.G. (1998). *J. Pediatr. Surg.*, **33**, 225-228.
- Pabst R. and Rothkötter H.J. (1999). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **72**, 167-173.
- Pathirana C.; Goulding N.J.; Gibney M.J.; Gallagher P.J.; Pitts T.J.; Taylor T.J. (1981). *Proc. Nutr. Soc.*, **40**, 26 A.
- SAS. 1990. *SAS/STAT® User's Guide (Version 6, Fourth Edition)*. SAS Inst. Inc., Cary, NC
- Solan Aguilar G.I.; Kelly G.; Beshah E.; Douglass L.W. y Lunney J.K. (2001). *Develop. comp.. Immunol.* **25**, 245-263.
- Strobel S. and Mowat A. M. (1998). *Immunol. Today*, **19**, 4, 173-181
- Van Soest J.P., Robertson J.B., Lewis B.A., 1991. *J. Dairy Sci.* **74**, 3583-3597.