

RESPUESTAS A UN RETO CON LPS DE *E. COLI* DE OVEJAS LECHERAS SUPLEMENTADAS CON DISTINTOS NIVELES DE BETA-GLUCANOS DE CEBADA

Elhadi, A., Guamán, S., Caja, G., y Albanell, E.

Grupo de Recerca en Remugants (G2R), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España; E-mail: elena.albanell@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Los β -glucanos (BG), componentes de la pared celular especialmente abundantes en cereales, levaduras y hongos (Rieder y Samuelsen, 2012), han despertado reciente interés para su utilización como ingredientes alimenticios funcionales y bioactivos, dados sus múltiples efectos en la salud (Lazaridou y Biliaderis, 2007). El grano de avena y cebada contiene normalmente entre 2-11% BG (Rieder y Samuelsen, 2012), pero existen variedades especialmente ricas en BG. Además, los BG de cebada, dado su bajo peso molecular y alta solubilidad, pueden proporcionar sustratos fácilmente asimilables y ser incluidos en raciones para animales de producción (Reilly et al., 2010).

Estudios en peces (Hofer y Pospíšil, 2011; Meena et al., 2013) y ratones (Samuelsen et al., 2014) han indicado efectos inmuno-estimuladores y profilácticos de los BG contra infecciones bacterianas. En rumiantes, los BG son rápidamente solubilizados en el rumen (Degradabilidad Efectiva_{16h} = 95,6%; Degradabilidad Teórica = 100%), pero, pese a ello, son rápidamente absorbidos y capaces de ser detectados en sangre, tal como indicaron Torrent (2017) y Torrent et al. (2017) en ovejas lecheras suplementadas con BG de cebada. Igualmente, Contreras-Jodar et al. (2017) detectaron diferencias en el metaboloma de la leche y orina de las mismas ovejas, poniendo en evidencia sus efectos metabólicos en rumiantes.

El lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*, es una endotoxina capaz de producir citoquinas pro-inflamatorias al estimular el sistema inmune, lo que permite evaluar de forma no infecciosa la capacidad de respuesta del sistema inmune de organismos vivos (Jones et al., 2004) mediante el llamado "LPS challenge" (reto de LPS).

El objetivo de este trabajo consistió en estudiar la respuesta inmune a corto plazo de ovejas lecheras suplementadas con BG de cebada, por diferentes vías, al someterlas a un reto de LPS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: Se utilizaron 36 ovejas lecheras (18 Manchegas y 18 Lacaunes), al final de lactación, del Servei de Granges i Camps Experimentals (SGCE) de la UAB (Bellaterra). Tras un periodo de adaptación (7 d), en el que recibieron en la sala de ordeño un suplemento de 350 g/d de cebada cv. Hispanic (Semillas Batlle, Lleida) con 3,8% de BG, las ovejas se dividieron en 3 lotes equilibrados (según raza, peso, condición corporal, producción de leche, número de lactación, días en lactación y células somáticas), a los que se aplicaron aleatoriamente los tratamientos alimentarios experimentales durante 14 d.

Tratamientos experimentales:

- Control (CO): manteniendo la misma suplementación que en la adaptación (13,3 g/d BG);
- Suplementación oral (SO): suplementadas con cebada cv. Annapurna (Semillas Batlle) con 10% de BG (35 g/d BG);
- Aplicación intraperitoneal (IP): mismo tratamiento que CO pero recibió una única inyección intraperitoneal de 140 mL de una solución de BG de cebada al 1,4% (2 g BG).

A los 9 d de iniciar los tratamientos experimentales (d 0), todas las ovejas se sometieron a un reto de LPS, inyectando 1 mL de una solución de endotoxina de *E. coli* (5 μ g/mL; Sigma-Aldrich, St Louis, MI) en una mitad de la ubre y 1 mL de suero fisiológico (0,9% NaCl; B Braun, Barcelona) en la otra, de forma aleatoria. El ordeño por ubre entera se realizó 2 veces al día (7:00 y 17:00 h) en una sala 2x12 con línea alta (Amarre Azul-1, DeLaval, Alcobendas, España) a 40 kPa, 120 p/min y 50% RP.

Medidas, muestras y análisis: Durante los d 0-5 se tomaron datos de temperatura rectal (AccuVet, Tecnovet, Barcelona) y producción de leche, así como muestras de leche y sangre a nivel individual. Las muestras de leche se conservaron a 4°C, previa adición de Bronopol (Broad Spectrum Micro-TabsII, D&F Control Systems, San Ramon, CA) y se determinó su composición (Milkosan, Foss Electric, DK) y recuento de células somáticas (RCS) (Fossomatic 5000, Foss Electric). Las muestras de sangre se tomaron en ayunas,

antes del ordeño de la mañana, utilizando viales con heparina de Li (DD Vacutainer, Belliver Ind. Estate, Plymouth, UK), de los que se obtuvo plasma. Las muestras se conservaron a -20°C para análisis de interleucinas (IL1 α y β) por ELISA (Assam, Canadá).

Análisis estadístico: Los datos se analizaron mediante el procedimiento MIXED para medidas repetidas de SAS (v.9.4). El modelo incluyó como efectos fijos el tratamiento y el tiempo, además de su interacción, y como efectos aleatorios la ubre (oveja) y el error residual. Los resultados se presentan como medias mínimo cuadráticas (lsm) y las diferencias se separaron con PDIFF a $P < 0,05$. Se consideraron tendencias a $P < 0,10$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron diferencias en el peso vivo ni condición corporal de las ovejas ($P > 0,05$), así como tampoco en el valor de las variables estudiadas, a lo largo del experimento (Tabla 1). Sin embargo, se observó una tendencia ($P = 0,06$) a la disminución del contenido de lactosa de la leche por efecto del reto con LPS. Esta disminución indicó la severa afectación de la glándula mamaria por el LPS, que fue menor en el tratamiento IP. Igualmente, el RCS aumentó por efecto del LPS, pero sin que se apreciaran diferencias entre tratamientos.

Tabla 1. Respuesta al reto con LPS de ovejas lecheras sometidas a distintos tratamientos con β -glucanos de cebada (CO, Control; SO, Suplementación oral; IP, Intraperitoneal).

Item	Valor inicial ¹ (d 0)	Reto (d 1-5)			Efecto medio del reto ¹	P-valor Reto	
		CO	SO	IP		T	d
T. rectal, $^{\circ}\text{C}$	$38,52 \pm 0,05^b$	38,80	38,90	38,80	$38,83 \pm 0,05^a$	0,13	0,001
Leche, kg/d	$0,75 \pm 0,05^a$	0,68	0,53	0,52	$0,58 \pm 0,08^b$	0,29	0,001
Composición, %							
Proteína	$6,54 \pm 0,14^b$	6,86	7,14	6,80	$6,93 \pm 0,21^a$	0,47	0,001
Lactosa	$4,37 \pm 0,08^b$	$3,64^x$	$3,50^x$	$3,80^y$	$3,64 \pm 0,09^a$	0,06	0,001
Grasa	$7,71 \pm 0,23^b$	8,44	9,13	8,72	$8,76 \pm 0,33^a$	0,35	0,001
Solidos totales	$11,8 \pm 0,9$	11,4	11,6	12,8	$11,9 \pm 0,8$	0,37	0,083
Urea, g/L	86 ± 2	84	87	81	84 ± 2	0,15	0,001
RCS, \log_{10}	$4,94 \pm 0,12^b$	5,73	5,70	5,87	$5,77 \pm 0,12^a$	0,59	0,001
Interleucinas, pg/mL							
IL α	318 ± 47	346	358	299	334 ± 76	0,84	0,27
IL β	141 ± 27	170	133	79	127 ± 42	0,31	0,19
IL $\alpha+\beta$	337 ± 43	308	416	326	350 ± 69	0,52	0,27

T, Tratamiento; d, Día; RCS, Recuento células somáticas $\times 10^3$. ^{a,b}Letras diferentes indican $P < 0,05$ entre inicial y media del reto; ^{x,y}Letras diferentes indican tendencia a $P < 0,1$ entre tratamientos; Interacción T \times d $P > 0,05$.

¹Medias \pm error estándar.

Todas las ovejas aumentaron su temperatura rectal respecto al d 0, durante el reto LPS, pero no se observaron diferencias entre tratamiento de BG. Tampoco se detectaron diferencias en los valores de IL1 α y β , o la suma de ellas, por los tratamientos de BG ni por efecto del tiempo (Figura 1). Pese a ello, sus valores numéricos aumentaron en el transcurso del experimento, coincidiendo con el aumento del RCS y en respuesta a la inflamación. Hay que señalar que las IL poseen un vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones (Briard et al., 2014; Rainard et al., 2016).

Es importante señalar que, tal como se observa en la Fig. 1A, los valores de IL del d 0 de las ovejas del grupo IP de tratamiento con BG fueron más bajos que los de las ovejas CO y SO ($P < 0,01$), así como también sus valores de RCS, aunque no significativamente. Esto indicó que fueron capaces de reconocer y responder rápidamente al LPS de *E. coli*, mediante el reclutamiento significativo de leucocitos a la glándula mamaria sin que se produjera un proceso de fuerte inflamación, lo que se tradujo en una captura y eliminación más efectiva de la endotoxina presente en la ubre.

En conclusión, el reto LPS estimuló una marcada respuesta inmune a corto plazo en ovejas suplementadas con BG, que resultó más efectiva al ser aplicados por vía intraperitoneal. Este estímulo de la respuesta inmune de las ovejas lecheras, podría proporcionar protección

contra infecciones intramamarias (mastitis). Es necesario completar los estudios a medio y largo plazo para validar los efectos de los BG de cebada y recomendar estrategias de utilización en la práctica.

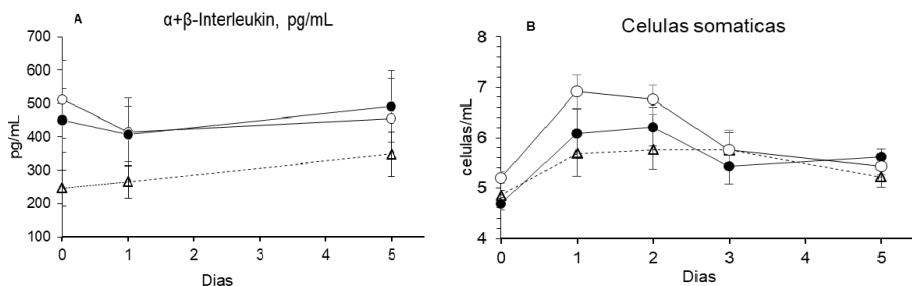


Figura 1. Interleucinas $\alpha+\beta$ (A) y Células somáticas (B) en ovejas suplementadas con β -glucanos de cebada (○, control; ●, suplementación oral; Δ, intraperitoneal).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Briard, N., Dadoun, F., Pommier, G., Sauze, N. & Lebouc, Y. 2014. *J. Endocrinol.* 164:361-369 • Contreras-Jodar, A.C., Mehaba, N., Albanell, E. & Caja, G. 2017. XVII Jornadas AIDA, Zaragoza, pp. 219-221. • Hofer, M. & Pospíšil, M. 2011. *Molecules.* 16:7969-7979 • Jones, K.L., de Kretser, D., Clarke, I.J., Scheerlinck, J.P.Y. & Phillips, D.J. 2004. *J. Endocrinol.* 182:69-80 • Lazaridou, A. & Biliaderis, C.G. 2007. *J. Cereal. Sci.* 46:101-118 • Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K. & Mukherjee, S.C. 2013. *Fish. Physiol. Biochem.* 3:43-457 • Rainard, P., Cunha, P. & Gilbert, F.B. 2016. *PLoS One* 8:e0154172 • Reilly, P., Sweeney, T., O'Shea, C., Pierce, K.M., Gigat, S., Smith, A.G. & O'Doherty, J.V. 2010. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 158:165-176 • Rieder, A. & Samuelson, A.B. 2012. *Mol. Nutr. Food Res.* 56:536-547 • Samuelson, A.B.C., Schrezenmeier, J. & Knutsen, S.H. 2014. *Mol. Nutr. Food Res.* 58:183-193 • Torrent, N. Tesis de Msci, IAMZ-CIHEAM, Zaragoza • Torrent, N., Mehaba, N., Love, S., Salama, A.A.K., Albanell, E. & Caja, G. 2017. XVII Jornadas AIDA, Zaragoza, pp. 216-218.

Agradecimientos: Paco Batlle (Semillas Batlle) e Ignacio Romagosa (UdL) por el soporte y suministro del material vegetal. Trabajo financiado por MINECO/FEDER (AGL2015-69435-C3-3-R) y Beca de formación del Gobierno de Ecuador (SENESCYT) a S. Guamán.

RESPONSE OF DAIRY SHEEP SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT LEVELS OF BETA-GLUCANS OF BARLEY TO A LPS CHALLENGE FROM *E. COLI*

ABSTRACT: The response to an *E. coli* LPS challenge was studied in dairy ewes (n = 36) at late lactation supplemented with different levels of barley β -glucans (BG). After an adaptation of 7 d, in which ewes were fed with 350 g/d of conventional barley, they were randomly assigned to 3 dietary treatments during 14 d: CO (conventional barley, 3.8% BG), SO (high BG-barley, 10% BG) and IP (conventional barley and intraperitoneal injection of 2 g BG). The LPS challenge was done by half-udder (0 or 5 μ g/half-udder) after 9 d of receiving the BG supplements. No differences between BG treatments were observed in the response to LPS on body weight, condition score, rectal temperature, interleukin α and β , but milk yield and composition varied by the LPS. Response to LPS vary by BG in the case of lactose milk content that was lower for the IP treatment. Moreover, the basal interleukin values were greater in the IP treatment, indicating that an effective BG supplementation may increase the immunity status of the animals and the protection of dairy ewes to mastitis.

Keywords: barley, betaglucans, dairy sheep, inflammation