



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

El nitrógeno ureico plasmático como indicador de desequilibrio en aminoácidos en los piensos de conejos

*Plasma urea nitrogen as an indicator of
amino acid imbalance in rabbit feeds*

Trabajo Fin de Máster

Valencia, Septiembre 2013

Pablo Jesús Marín García

Director/es
Juan José Pascual Amorós

Resumen

En las últimas décadas, el contenido proteico de los piensos de engorde en conejos se ha reducido para optimizar las fórmulas, minimizar el riesgo de trastornos digestivos, así como la excreción de N al ambiente. Bajo estas circunstancias, es fundamental el desarrollo de métodos que permitan evaluar el correcto ajuste de cada aminoácido de la dieta. El presente trabajo evaluó el nivel de nitrógeno ureico plasmático (PUN) como un posible indicador del desequilibrio aminoacídico en conejos de engorde. Para ello se formularon dos piensos: uno siguiendo las recomendaciones con 8.1 g de lisina por kg de materia seca (P8.1) y otro, deficitario, con 4.4 g de lisina por kg de materia seca (P4.4). Se utilizaron un total de 72 conejos en tres pruebas distintas: evolución diaria bajo alimentación *ad libitum* (Diario), y dos con restricción total del alimento durante las 10 h previas a la extracción de sangre, una restableciendo la alimentación a las 08:00h (Rest8h) y la otra a las 18:00 h (Rest18h). En todas ellas se realizó un diseño experimental con cambios donde se controló la ingestión. La sangre fue extraída, de la arteria central de la oreja seis veces por tratamiento (1 mL utilizando un catéter y almacenado en viales con EDTA), en el caso del control diario cada 4 h, desde las 08:00h , y en el caso de las restricciones, cada h tras el restablecimiento de la alimentación. En cuanto a la evolución diaria, el nivel de PUN estuvo vinculado a la ingestión previa, siendo ambos máximos a las 20:00h (15.9 mg/dL y 10.9 g/h) y mínimos a las 8:00h (13.4 mg/dL y 4.8 g/h). Los conejos alimentados con el pienso P4.4 presentaron una ingesta significativamente menor (-21.4 ± 4.6 g/d; $P < 0.01$) y un mayor nivel de PUN ($+2.13 \pm 26$ mg/dL; $P < 0.001$) que aquellos alimentados con un pienso P8.1, mostrando las mayores diferencias de PUN a las 08:00h ($+2.34 \pm 0.52$ mg/dL; $P < 0.001$). En caso de Rest8h, se obtuvieron datos para el PUN con una mayor variabilidad (probablemente debidos a la interferencia de la cecotrofia) mientras que en Rest18h, se redujo la variabilidad y se obtuvo la diferencia más significativa de los niveles de PUN entre tratamientos a las 21:00h ($+1.96 \pm 0.66$ mg/dL; $P = 0.003$). En conclusión, en el caso de las restricciones Rest18h podría ser el procedimiento más adecuado para evaluar desequilibrios aminoacídicos en la dietas de conejos de engorde.

Palabras clave: Conejo, aminoácido, nitrógeno ureico plasmático, ingestión.

Abstract

In last decades, the protein content in feeds of growing rabbit has been reduced with the objective to decrease the risk of digestive disorders, minimize N excretion to environment and to optimize diets. Under these conditions, a correct amino acid formulation feed could be crucial. This study evaluates the level of plasma urea nitrogen (PUN) as a possible indicator of amino acids deficit in growing rabbits. Two diets were formulated with 8.1 and 4.4 g of lysine per kg of dry matter, within the recommendations (P8.1) and below them (P4.4), respectively. A total of 72 growing rabbits were used in three different trials: *ad*

libitum feeding (Diario) or complete restriction during ten hours, re-feeding at 08:00h (Rest8h) or 18:00h (Rest18h). A design with change was used in the three trials, and feed intake between sampling was controlled. Blood was drawn from the central artery of the ear six times for each treatment (1mL using a catheter and stored in vials with EDTA), every four hours in Diario trial, and every hour since re-feeding in case of Rest8h and Rest18h trials. In trial Diario, changes in the level of PUN were associated to the previous intake, being both maximum at 20:00h (15.9 mg/dL and 10.9 g/d) and minimum at 8:00h (13.4 mg/dL and 4.8 g/d). Rabbits that were fed with P4.4 had significantly lower feed intake (-21.4 ± 4.6 g/d; $P < 0.01$) and higher level of PUN ($+2.13 \pm 26$ mg/dL; $P < 0.001$) than those fed with P8.1. Differences in PUN between diets were maximized at 04:00h to 12:00 ($+2.63 \pm 0.67$ mg/dL; $P < 0.001$). In case of trial Rest8h, PUN data presented a higher variability probably due to caecotrophy interference. Finally in trial Rest18h, PUN data presented a lower variability, being the most significant difference between treatments at 21:00h. ($+1.95 \pm 0.96$ mg/dL; $P = 0.0033$). In conclusion, PUN determination 3 h after re-feeding at 21:00 could be consider as an adequate method to evaluate aminoacid imbalance in growing rabbits.

Keywords: Rabbit, amino acid, plasma urea nitrogen, feed intake.

Resum

En les últimes dècades, el contingut proteic dels pinsos d'engreixament en conills s'ha reduït per optimitzar les fórmules, minimitzar el risc de trastorns digestius, així com l'excreció de N a l'ambient. En aquestes circumstàncies, és fonamental el desenvolupament de mètodes que permetin avaluar el correcte ajust de cada aminoàcid de la dieta. El present treball tracta d'avaluar el nivell de Nitrògen ureic plasmàtic (PUN) com un possible indicador del desequilibri aminoacídic en conills d'engreixament. Per això es van formular dues fabricacions de pinsos: un seguint les recomanacions amb 8.1 g de lisina per kg de matèria seca (P8.1) i un altre, deficitari, amb 4.4 g de lisina per kg de matèria seca (P4.4). Es van utilitzar un total de 72 conills en tres proves diferents: evolució diària amb alimentació *ad libitum* (Diari), i dos amb restricció total de l'aliment durant les 10 h prèvies a l'extracció de sang, una restablint l'alimentació a les 08: 00h (Rest8h) i l'altra a les 18:00 h (Rest18h). En totes elles es va realitzar un disseny experimental amb canvis, on es va controlar la ingestió. La sang va ser extreta, de l'artèria central de l'orella sis vegades per tractament (1 ml utilitzant un catèter i emmagatzemat en vials amb EDTA), pel cas del control diari cada 4 h, des de les 08: 00h, i pel de les restriccions, cada h després del restabliment de l'alimentació. Pel que fa a l'evolució diària, el nivell de PUN va estar vinculat a la ingestió prèvia, tots dos màxims a les 20: 00h (15.9 mg / dL i 10.9 g / h) i mínims a les 8: 00h (13.4 mg / dl i 4.8 g / h). Els conills alimentats amb el pinso P4.4 van presentar una ingesta significativament

menor (-21.4 ± 4.6 g / d; $P < 0.01$) i un major nivell de PUN ($+ 2.13 \pm 26$ mg / dl; $P < 0.001$) que aquells alimentats amb un pinso P8.1, mostrant les majors diferències de PUN a les 08: 00h ($+ 2.34 \pm 0.52$ mg / dL; $P < 0.001$). En cas de Rest8h, es van obtenir dades per al PUN amb una major variabilitat (probablement a causa de la interferència de la cecotròfia) mentre que en Rest18h, es va reduir la variabilitat i es va obtenir la diferència més significativa dels nivells de PUN entre tractaments a les 21: 00h ($+ 1.96 \pm 0.66$ mg / dL; $P = 0.003$). En conclusió, en el cas de les restriccions Rest18h podria ser el procediment més adequat per avaluar desequilibris aminoacídics a la dietes de conills d'engreixament.

Paraules clau: Conill, aminoàcid, Nitrogen ureic plasmàtic, ingestió.

Introducción

España es el tercer país europeo productor de carne de conejo (FAOSTAT, 2013). Uno de los factores que ha permitido el incremento de esta producción ha sido la selección genética indirecta en las líneas paternas por velocidad de crecimiento (VC) (Baselga, 2004), la cual ha mejorado el índice de conversión (IC) debido a su correlación genética negativa (Blasco, 1989). Aunque, paralelamente, es posible que las necesidades nutricionales de estos animales hayan sido modificadas. A fin de asegurar la expresión del potencial genético, las dietas de engorde deberán aportar los nutrientes necesarios que permitan afrontar estas crecientes exigencias.

La alimentación supone el principal coste en las granjas de conejos. Con el fin de reducir dichos costes se intenta reducir el IC, factor de mayor peso económico en la producción cunícola (Cartuche *et al.*, 2014). Para optimizar dicho índice, era frecuente encontrar un exceso de proteína en los piensos de engorde comerciales, para evitar déficits asociados a la presencia de algún aminoácido limitante. Sin embargo, las recomendaciones sobre el contenido proteico de estos piensos han sido reducidas considerablemente en las últimas décadas (Carabaño *et al.*, 2009), mientras que el contenido en fibra ha aumentado (Trocino *et al.*, 2013), con el objetivo de optimizar mejor las dietas, minimizar la excreción de N al medio ambiente, con el consiguiente impacto ambiental producido (Martens, 2009). Aunque principalmente como consecuencia de la irrupción de la enteropatía mucoide del conejo, enfermedad de etiología desconocida, pero cuya incidencia aumenta al aumentar el flujo de nitrógeno ileal (de Blas *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2009).

En los últimos años, han aparecido algunos indicios de que la selección por velocidad de crecimiento pudiera estar viéndose penalizada por la utilización de piensos de menor contenido proteico para reducir la incidencia de la enteropatía (Marín García *et al.*, 2016a). De hecho, aunque el índice de

conversión ha mejorado considerablemente en los últimos 20 años, la diferencia entre las líneas maternas y paternas no lo ha hecho del mismo modo (Feki *et al.*, 1996; Marín García *et al.*, 2016a). Pudiera así darse el caso de que los animales seleccionados presentan posiblemente unas necesidades de proteína particularmente elevadas (especialmente de aminoácidos esenciales), y son alimentados empleando piensos con niveles proteicos seguramente deficitarios, lo cual podría afectar a la definición de los rankings, y por consiguiente a la difusión genética a las granjas comerciales.

En un trabajo previo (Marín-García *et al.*, 2016a), hemos podido corroborar que aquellos animales con elevada VC (>55 g/d) presentan una similar digestibilidad a nivel ileal y fecal de la materia seca, proteína y aminoácidos del pienso que los animales de baja VC (<35 g/d). Además, los animales con una elevada VC presentaron una retención proteica y aminoacídica en el cuerpo vacío menor de la que se esperaría en función de su crecimiento (Marín-García *et al.*, 2016b). De hecho, se estimó que aquellos conejos con una VC de 70 g/d (60 g/d de incremento del cuerpo vacío) necesitarían comer 2.8 g/d más de proteína digestible (PD), por lo que las recomendaciones deberían aumentarse hasta 126 g PD/kg MS, o formular el pienso en función de las necesidades particulares en aminoácidos de estos animales. Todos estos resultados, podrían revelar así un posible déficit proteico en la alimentación de los conejos con altas VC, pudiendo estar afectando a la definición de los rankings en el proceso de selección genética.

Por todo ello, resulta fundamental determinar las necesidades proteicas, a nivel de aminoácidos, para cada edad, estado fisiológico y potencial genético. El conocimiento sobre nutrición proteica en conejos es escaso en comparación con otras especies (Carabaño *et al.*, 2009), y sería de gran ayuda el desarrollo de un método adecuado que permita optimizar las necesidades de aminoácidos, así como para la detección de desequilibrios en los piensos, de una forma fácil y rápida.

El aumento del nitrógeno ureico plasmático (PUN), que corresponde con la cantidad de nitrógeno en forma de urea circulante por el torrente sanguíneo, podría ser un buen indicador del déficit en aminoácidos. En teoría, un pienso con déficit de un aminoácido esencial llevaría a la metabolización del resto en el hígado, dando lugar a urea que sería liberada al torrente sanguíneo para su eliminación a través de los riñones, lo que llevaría a un aumento del PUN. De hecho, ya se ha estudiado el potencial de este parámetro en otras especies, como en cerdos (Brown y Cline, 1974).

El nivel de PUN no solamente depende del nivel de desequilibrio aminoacídico, sino también de la ingestión proteica, del balance entre su síntesis hepática y su eliminación renal. Sin embargo, no existen estudios sobre la evolución diaria de este parámetro en conejos, así como tampoco trabajos previos en lo que se

haya propuesto una metodología para cuantificarlo y utilizarlo como indicador de potenciales desequilibrios.

El presente trabajo tiene como objetivo valorar la evolución diaria del PUN en conejos de engorde, así como su posible potencial para detectar deficiencias en aminoácidos y establecer la metodología necesaria para optimizar dicho proceso.

Material y métodos

Piensos

Se formularon dos piensos experimentales a partir de una misma mezcla basal. El primero de ellos (P8.1) fue un pienso formulado siguiendo las recomendaciones de todos los nutrientes para conejos de engorde (de Blas y González-Mateos, 2010), incluyendo las de lisina [con 8.1 g de lisina por kg de materia seca (MS)], a través de inclusión de L-lisina sintética (0.47%). El segundo pienso (P4.4), se obtuvo a partir de la misma mezcla basal pero sin añadir la L-lisina sintética, por lo que su contenido en lisina (4.4 g/kg MS) se encontraba lejos de las recomendaciones actuales, asegurando un déficit de este aminoácido. Los ingredientes y composición química de las dietas experimentales queda recogida en la Tabla 1.

Diseño experimental

Se diseñaron y realizaron tres pruebas distintas para conocer la evolución diaria del PUN en conejos de engorde y para desarrollar un método que permita detectar desequilibrios en la fórmula aminoácidica a partir de este parámetro.

La primera de estas pruebas fue con animales alimentados *ad libitum* (Diario), que permitiría conocer la evolución diaria del PUN en los animales con un pienso hipotéticamente equilibrado y desequilibrado, pero expuestos a la variabilidad del comportamiento alimentario del animal. A diferencia a lo que ocurre en otras especies donde la alimentación puede producirse en 1 o 2 eventos puntuales, los conejos se caracterizan por tener muchos pequeños eventos diarios (Bieller *et al.*, 1995). Como consecuencia de este comportamiento, y con el objetivo de fomentar una menor variabilidad individual en la ingestión previa se diseñaron otras dos pruebas en la que el pienso fue restringido durante 10h, una donde se restableció la alimentación a las 08:00h (Rest8h) y la otra a las 18:00h (Rest18h).

Tabla 1: Ingredientes y composición química de las dietas experimentales.

Ingredientes (g/kg)	Dieta P8.1	Dieta P4.4	Composición química (g /kg ms)	Dieta P8.1	Dieta P4.4
Trigo grano	288		Energía bruta (kcal / kg ms)	2550	
Torta de girasol 30	165		Proteína bruta	158	
Aceite de soja	40		Proteína digestible	109	
Paja cereal	78.4		Fibra neutro detergente	366	
Heno de alfalfa	360		Fibra ácido detergente	216	
Granilla	45		Lignina ácido detergente	57	
L-lisina HCl	4.7	0	Hem	149	
DI-metionina	1.55		Almidón	183	
L-treonina	2.2		Extrácto etéreo	61	
Fosfato bicálcico	3.5		Calcio	11.4	
Arginina	1.45		Fósforo	4.9	
Sal	5.2		Sodio	5.3	
Corrector	5		Cloro	9.7	
			Ácido aspártico	13.4	
			Serina	60.1	
			Ácido glutámico	20.9	
			Glicina	70.8	
			Histidina	2.51	
			Amoniaco	4.9	
			Arginina	8.1	
			Treonina	6.88	
			Alanina	5.13	
			Prolina	8.57	
			Cisteina	1.56	
			Tirosina	2.67	
			Valina	6.73	
			Metionina	3.23	
			<u>Lisina</u>	<u>8.1</u>	<u>4.4</u>
			Isoleucina	5.13	
			Leucina	8.8	
			Fenilalanina	6.47	

Se utilizaron un total de 24 conejos para cada prueba. A los 49 días de vida los animales fueron alojados en jaulas individuales. Tras una semana de adaptación a la jaula, y un día antes del primer control, los animales fueron divididos en dos grupos a los que se les empezó a administrar uno de los dos piensos experimentales. Al día siguiente (57 días de vida) se controló la ingestión y se extrajo sangre de la arteria central de la oreja (1 mL mediante catéter y en almacenados en viales con EDTA) cada 4 h (08:00h, 12:00h, 16:00h, 20:00h, 24:00h y 04:00h) en el caso del control *ad libitum*, o cada h tras

el restablecimiento de la alimentación (Rest8h: 08:00h, 09:00h, 10:00h, 11:00h, 12:00h y 13:00h; Rest18h: 18:00h, 19:00h, 20:00h, 21:00h, 22:00h y 23:00h).

La ingestión de pienso individual en el periodo previo (durante 4h en Diario y 1h en Rest8h y Rest18h) fue controlada en el momento de cada extracción. A las 8:00 h del día siguiente (día 58 de vida), se intercambi6 el pienso de los animales y, tras un día de adaptación al nuevo pienso, se procedió a repetir los controles de ingestión y extracción el día 59 de vida. El pienso experimental se introdujo sólo un día antes de los controles para evitar mecanismos de adaptación y/o deficiencia.

Las muestras de sangre fueron inmediatamente centrifugadas, 5 min a 2500 rpm, y el plasma sobrenadante se congeló a -20°C hasta su posterior análisis.

Análisis químico

La determinación del PUN se realizó utilizando un kit para determinar urea en plasma (Urea/BUN-COLOR; BioSystems S.A., Barcelona, España). En el cual las muestras eran descongeladas y atemperadas, tras ello se pipeteaban 1 μL en tubos de ensayo correctamente identificados (realizando cada tanda un blanco, carente de muestra, y un patrón, con el objetivo de corregir posibles errores) y posteriormente se añadía a cada muestra 1 ml del Reactivo A (Salicato s6dico 62 mmol/L, nitroprusiato s6dico 3.4 mmol/L, tamp6n fosfatos 20mmol/L y ureasa 500U/ml) tras esta adici6n, las muestras eran sometidas a una agitaci6n e incubaci6n durante 5 minutos a 37°C . A continuaci6n se pipeteaba 1 ml del Reactivo B (Hipoclorito s6dico 7mmol/L e hidr6xido s6dico 150 mmol/L) y se volvía a agitar e incubar durante 5 minutos a 37°C . Finalmente se procedía a la lectura de absorbancia del patr6n y de la muestra a 600 nm frente al blanco, siendo el color estable durante al menos dos h.

El contenido de aminoácidos de la dieta fue determinado por HPLC siguiendo el método descrito por Kivi (2000).

Análisis estadístico

Los datos de nivel de PUN y de ingestión previa fueron analizados estadísticamente utilizando el paquete estadístico SAS (2009). Se utiliz6 un modelo con cambios (cuadro latino balanceado) incluyendo como efectos fijos el animal ($n=24$, animales por tratamiento), el día de control (57 y 59), el pienso (P8.1 y P4.4) y la h del día así como sus interacciones.

Resultados y discusi6n

En la Tabla 2, se muestra, para la prueba del control Diario, la evoluci6n de la ingestión durante las cuatro h previas a cada extracci6n de sangre. Como se puede ver, la ingestión fue significativamente mayor ($P<0.001$) entre las 16:00h y 20:00h (24% de la ingestión diaria), que entre las 12:00h y 16:00h h y entre 20:00h y 24:00h (18 y 20%, respectivamente), siendo todavía menor entre las

08:00h y 12:00 h y entre las 00:00h y 04:00h (13 y 14%, respectivamente), y la más baja entre las 04:00h y 08:00 h (11%). Estos resultados son bastante similares a los interpolados para esta misma edad (8 semanas de vida) a partir de las observaciones de Bellier *et al.* (1995), realizadas a las 6 y 16 semanas de vida (9, 11, 16, 24, 21 y 19% de ingestión diaria para las cuatro h previas a las 08:00h, 12:00h, 16:00h, 20:00h, 0:00h y 04:00h, respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto, que el manejo experimental utilizado no parece haber modificado el comportamiento de ingestión de los animales, produciéndose el pico de ingestión al final del periodo de luz, y que el 60% del pienso es consumido durante el período de oscuridad, tal y como recoge Gidenne *et al.* (2010). En cuanto a los niveles de PUN, se puede observar como siguen una tendencia similar a la ingestión ($P < 0.001$), siendo mayores a medida que aumenta la ingestión previa ($P < 0.001$). Esta similitud tiene bastante sentido, ya que según la definición de PUN, al aumentar la ingestión, los valores de urea en sangre deberían ser mayores debido a una mayor catálisis hepática de los aminoácidos sobrantes en valor absoluto.

Tabla 2. Ingestión durante las cuatro h previas y nitrógeno ureico plasmático (PUN) en función de las h del día.

	H del día						P-valor
	8:00	12:00	16:00	20:00	0:00	4:00	
Ingestión (g/h)	4.84±0.33 ^a	6.02±0.33 ^b	8.03±0.33 ^c	10.86±0.33 ^d	8.91±0.33 ^c	6.48±0.33 ^b	0.0001
PUN (mg/dL)	13.44±0.46 ^a	13.95±0.45 ^a	14.26±0.46 ^{ab}	15.85±0.46 ^c	15.39±0.45 ^{bc}	15.31±0.45 ^{bc}	0.0010

Siendo letras a, b y c aquellos valores que presentan diferencias estadísticamente significativas entre filas.

Tal y como se puede observar en la Tabla 3, aquellos animales alimentados con el pienso P4.4 presentan una ingesta significativamente menor (-21.4 ± 4.6 g/d; $P < 0.01$) y un mayor PUN ($+2.13 \pm 2.6$ mg/dL; $P < 0.001$) que aquellos alimentados con un pienso formulado según las recomendaciones (P8.1). Estos datos están en concordancia con los obtenidos para otras especies, donde se comprobó que la restricción de algún aminoácido provocó un aumento de los niveles de PUN (Lenehan *et al.*, 2003). De hecho, Coma *et al.* (1995), propone que el PUN puede ser utilizado para determinar rápidamente los requerimientos de lisina en cerdos. Es bien conocido que una deficiencia o desbalance en aminoácidos produce una desviación de la proteína como fuente de energía, un aumento de los niveles de urea en sangre y una reducción del consumo de los animales (Forbes, 1995). De hecho, algunos autores expresan el nivel de PUN en gramos de urea en plasma por día, animal y kg de pienso ingerido (por ejemplo en cerdos; Brown y Cline, 1974). Sin embargo, en conejos, la expresión del PUN en función del nivel de ingestión durante las cuatro h previas, incrementó el error estándar del 1.8% (cuando se expresa en

mg/dL) a un 4.2% (mg/dL g), y la inclusión de la ingestión previa como covariable no tuvo efecto significativo sobre las diferencias de PUN entre el pienso equilibrado y el desequilibrado.

Como se ve en la Figura 1, el menor consumo observado con el pienso P4.4 fue especialmente entre las 12:00h y las 00:00h, coincidiendo con los períodos de mayor consumo de pienso, siendo las diferencias no significativas a partir de dicho momento.

Tabla 3. Ingestión durante las cuatro h previas y nitrógeno ureico plasmático (PUN) en función del tipo de pienso (P8.1 y P4.4 con 8.1 y 4.4 g de lisina por kg de materia seca, respectivamente).

	Pienso		P-valor
	P8.1	P4.4	
Ingestión (g/h)*	7.96±0.19	7.09±0.19	0.0015
PUN (mg/dL)	13.61±0.26	15.75±0.26	0.0001
PUN (mg/dL g)	1.99±0.09	2.60±0.09	0.0001

* Interacción pienso x h del día (P=0.0663).

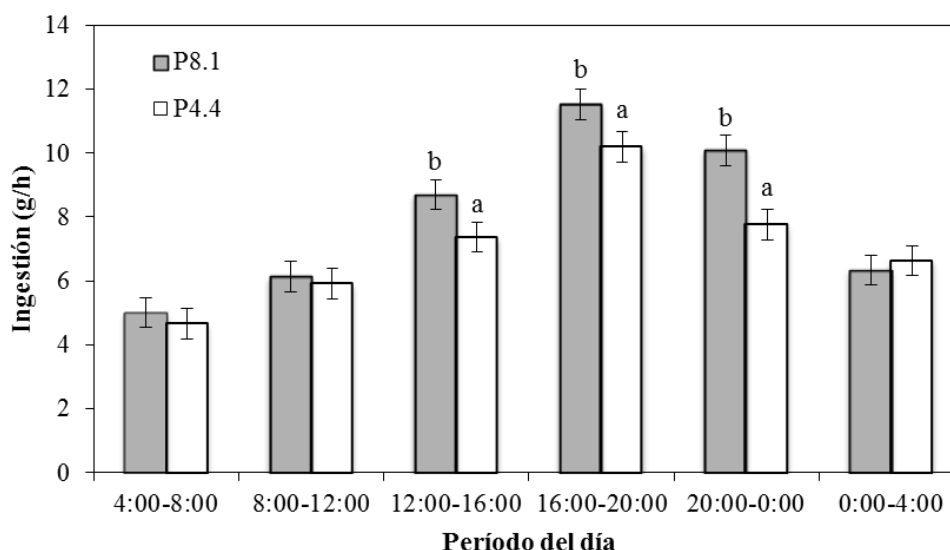


Figura 1. Ingestión durante las cuatro h previas a la extracción (g/h) en función de la h del día y del tipo de pienso (P8.1 y P4.4 con 8.1 y 4.4 g de lisina por kg de materia seca, respectivamente). Barras para un mismo período del día que no comparten letra son diferentes significativamente con un $P < 0.05$.

En la Figura 2, se representa la evolución del PUN absoluto (Figura 2a) o corregido por la ingestión previa (Figura 2b) para los dos piensos experimentales a lo largo de un día. Cuando los animales fueron alimentados con un pienso equilibrado (P8.1, línea continua), y como era de esperar, el PUN absoluto mostró una evolución muy similar a la observada para la ingestión de pienso (Figura 1). Cuanto más ingestión, más PUN se obtuvo en

sangre (Figura 2a). De hecho, cuando los valores de PUN son corregidos por su ingestión durante las cuatro h previas a la extracción, se observa que la concentración de PUN por cantidad de pienso ingerido es similar a lo largo del día, con valores mínimos entre las 16:00h y 00:00h del día (Figura 2b). Estos resultados indicarían que, con un pienso equilibrado, el nivel de PUN de los conejos de engorde es mínimo (13.6 mg/dL) y sólo aumentaría al aumentar la ingestión (más catabolismo de aminoácidos sobrantes en valor absoluto).

Por el contrario, al distribuir un pienso claramente desequilibrado (P4.4, línea discontinua), los valores de PUN absolutos son siempre elevados no existiendo grandes diferencias a lo largo del día (Figura 2a). Probablemente, una elevada proporción de aminoácidos no disponibles para la síntesis proteica, podría estar llevando al hígado (no adaptado a dicha dieta) a una constante catálisis de dichos aminoácidos a lo largo del día, siendo los niveles de urea en sangre máximos. De hecho, sólo se observa una pequeña reducción significativa tras el período de menor ingestión (a las 16:00h), siendo máximo tras el periodo de máxima ingestión (a las 04:00 h).

Bajo estas condiciones se observa que, en aquellos períodos del día en los que la ingestión es elevada, la diferencia entre el PUN de un pienso equilibrado y uno desequilibrado se ve reducida, mientras que las diferencias entre ellos se maximiza a las 08:00h (+2.34 mg/dL, que su pone un aumento del 33% del PUN), por lo que a priori las primeras h de la mañana podría ser un momento adecuado para la posible evaluación de deficiencias en aminoácidos en piensos de conejos de engorde.

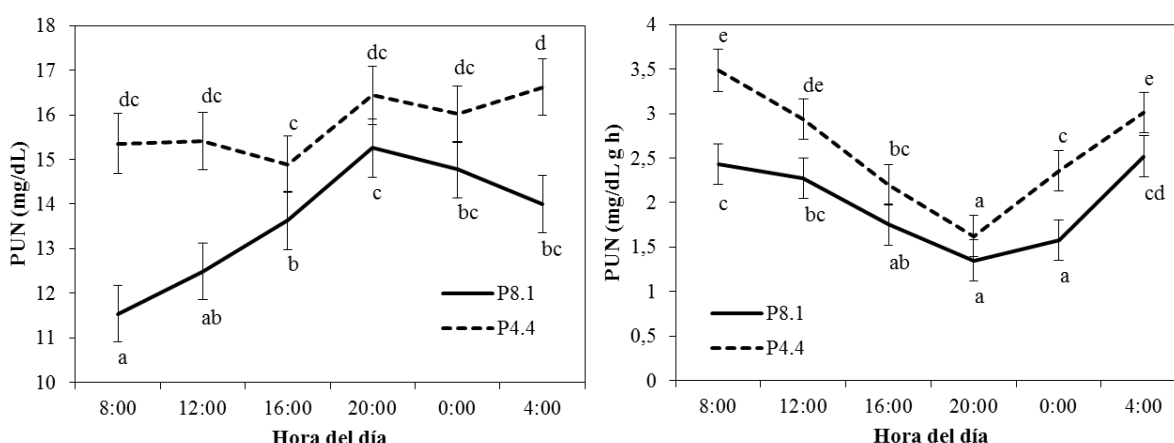


Figura 2. Nitrógeno ureico plasmático (PUN), (a) en mg por dL y (b) en mg por dL, g de pienso y h, en función de la h de extracción y el tipo de pienso (P8.1 y P4.4 con 8.1 y 4.4 g de lisina por kg de materia seca, respectivamente) Para el control Diario. medias que no comparten letra son diferentes significativamente con un $P < 0.05$.

Una vez conocida la evolución diaria del PUN, se procede a estudiar cuál es el comportamiento del PUN tras una restricción alimentaria. En un principio, la

restricción debería mejorar la capacidad de discriminación entre dietas, ya que debería homogenizar la ingestión previa a la extracción de sangre, al mostrar los animales una ingestión similar, sincrónica y elevada tras un periodo largo de restricción, y por tanto mejoraría la relación entre el grado de desequilibrio de la dieta y el aumento del nivel de PUN. La Figura 3 representa la evolución del PUN absoluto para los dos piensos experimentales a lo largo de las diferentes extracciones tras el periodo de restricción, para las dos pruebas: Rest8h y Rest18h donde se puede observar como en prácticamente la totalidad de los casos (92%), los valores de PUN fueron mayores para P4.4 que para P8.1 (de media 18.25 ± 0.56 y 16.98 ± 0.56 mg/dL, respectivamente; $P < 0.001$). Además, los valores medios obtenidos para el PUN fueron mayores tras restricción (16.98 ± 0.56 g/h) que los observados *ad libitum* (14.7 ± 0.64 g/h), esto puede ser debido a la mayor ingestión que se produce al ofrecer de nuevo el alimento (7.52 ± 0.47 vs 19.2 ± 1.26 g/h).

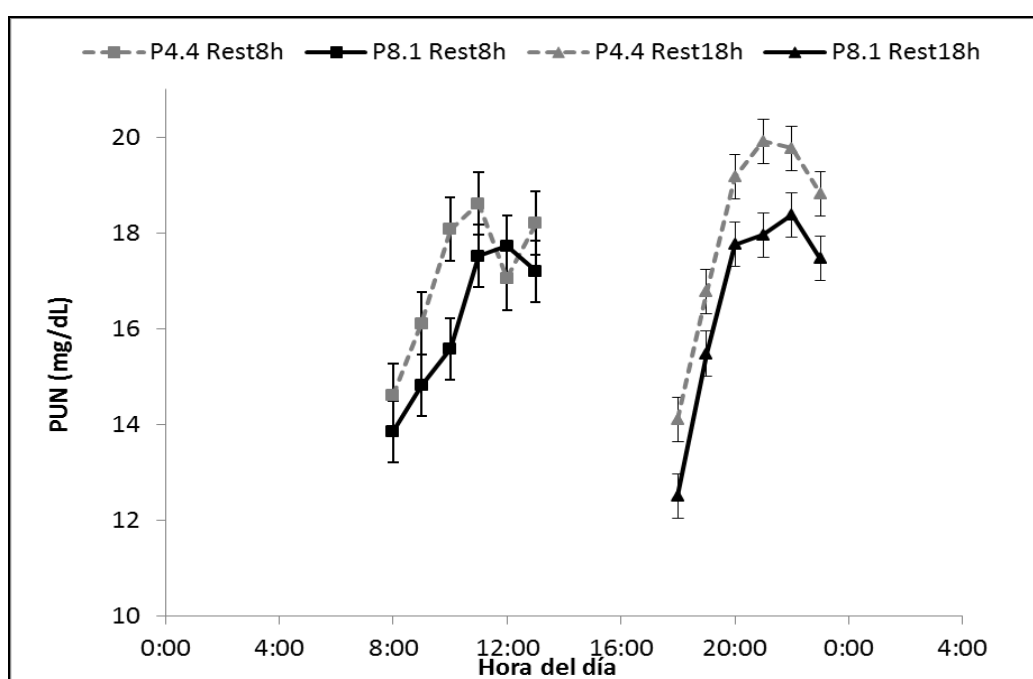


Figura 3. Valores de nitrógeno ureico plasmático (PUN) en mg por dL de los diferentes piensos (4.4g y 8.1g de lisina por kg de materia seca) en función de la h de extracción para los distintos tratamientos: Extracciones tras 10 h de ayuno a las 08:00h (Rest8h) y a las 18:00h (Rest18h).

Al comparar ambas restricciones, se observa que Rest18h lleva a unos valores medios mayores de PUN (16.61 ± 0.65 vs 17.34 ± 0.46 mg/dL para Rest8h y Rest18h, respectivamente; $P < 0.01$) debido, probablemente, a la mayor ingestión (15.6 ± 1.2 vs 22.7 ± 1.2 g/d respectivamente; $P < 0.01$). Esta diferencia en la ingestión puede deberse a que el comportamiento alimentario de los conejos de engorde no es uniforme a lo largo del día, produciéndose ésta en mayor medida en los periodos cercanos al crepúsculo (Bellier *et al.*, 1995).

Por otro lado, la evolución del PUN tras ambas restricciones fue similar. El valor máximo se alcanzó a las tres h del restablecimiento de la alimentación. El rápido aumento del nivel de PUN entre la primera extracción (justo antes del restablecimiento del pienso y momento previo a la máxima ingestión; 10.81 ± 1.27 g/h) con respecto a las extracciones a las 2 y 3 h posteriores podría indicar que el proceso de catabolismo de los de los aminoácidos sobrantes en este tipo de animales alcanzaría su máximo aproximadamente entre las 2 y 3 h posteriores a su ingestión. A partir de ese momento, el nivel de PUN se estabiliza, e incluso empieza a reducirse como consecuencia de la caída de la ingestión en las siguientes h tras el restablecimiento del pienso (6.81 ± 1.27 g/h).

La Figura 4 muestra la diferencia media (y su error estándar) entre los valores de PUN con el pienso P4.4 con respecto al P8.1 en las tres pruebas realizadas. Como se puede observar, con la excepción de dos momentos (8:00h y 12:00h de la prueba Rest8h), la diferencia entre ambos piensos fue significativamente mayor que cero, que apoya la hipótesis de que el nivel de PUN sería mayor en la sangre de conejos de engorde alimentados con un pienso desequilibrado que aquellos alimentados con otro más balanceado.

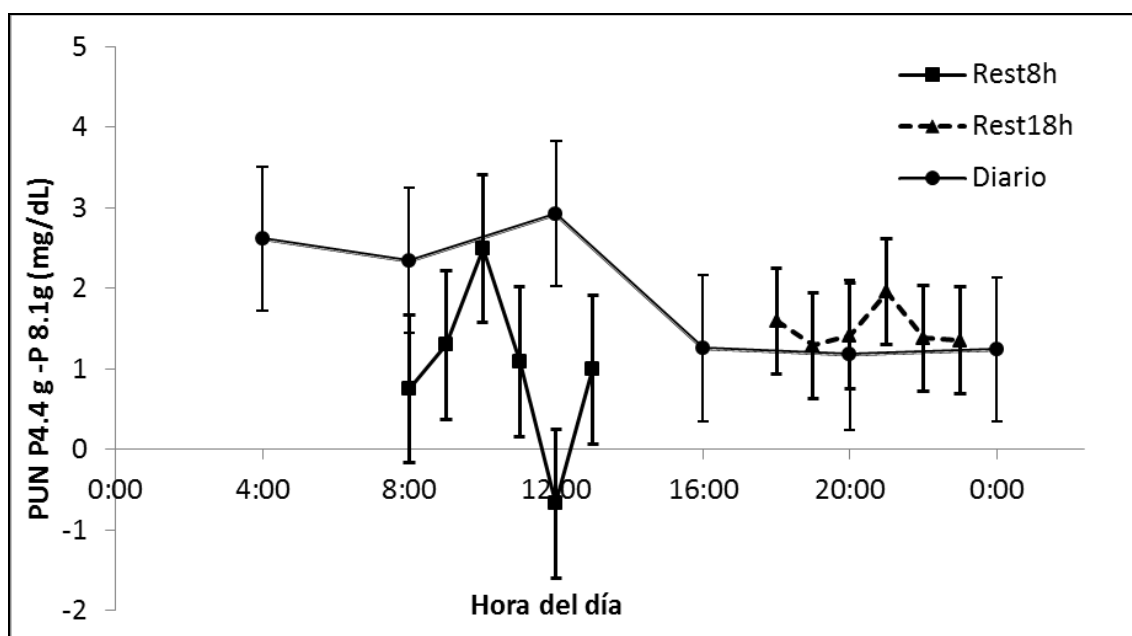


Figura 4. Diferencia entre los valores de nitrógeno ureico plasmático (PUN) en mg por dL entre los piensos experimentales (4.4 g – 8.1 g de lisina por kg de materia seca) en función de la h de extracción en las tres pruebas: Alimentación ad libitum (Diario), Extracciones tras 10 h de ayuno a las 08:00 am (Rest8h) y a las 18:00h (Rest18h).

Sin embargo con el objetivo de proponer el mejor método y la h más adecuada para producir la extracción y determinación del PUN, se debe tener en cuenta tanto el valor absoluto de las diferencias en PUN obtenidas entre piensos, así como el error estándar de dicha diferencias. Se ha de tener en cuenta que en el presente trabajo se ha trabajado con piensos en los que, aunque sólo se

encontraban desequilibrados en un solo aminoácido, el desequilibrio se había forzado (55% de las necesidades de lisina). Las mayores diferencias entre ambos piensos se encuentran para Diario a las 04:00h, 08:00h y 12:00h ($+2.35\pm 0.52$ mg/dL; $P<0.001$). Sin embargo, los errores estándar obtenidos en animales alimentados *ad libitum* fueron bastante elevados (0.91 mg/dL)

Sorprendentemente, la restricción del pienso durante la noche (Rest8h) llevó a una baja diferencia entre los niveles de PUN entre piensos una vez restablecida la alimentación (incluso no diferente a cero en dos ocasiones) y también a un error estándar para dicha diferencia (0.92 mg/dL) similar al observado *ad libitum*. Esto puede ser debido a la interacción producida por la cecotrofia y su papel para sintetizar aminoácidos de origen bacteriano (Fraga, 1998; Carabaño *et al.*, 2000). La cecotrofia tiene lugar a primeras h de la mañana, y puede llegar a suponer entre un 10 y un 30% de la proteína diaria ingerida (Villamide *et al.*, 2009 y Hirakawa, 2001). En circunstancias de restricción, la contribución global sería aún superior, lo que explicaría la reducción de las diferencias entre piensos, y la posible asincronía de su práctica entre individuos podría explicar la elevada variabilidad observada. Sería de interés para un futuro testar la posibilidad de repetir esta prueba evitando la ingestión de cecotrofos para confirmar estas sospechas, aunque sería una complicación a nivel metodológico.

Por el contrario, los animales restringidos durante el día (Rest18h) mostraron en todo momento un mayor PUN con el pienso desequilibrado ($+1.5\pm 0.66$ mg/dL), tendencia similar a la observada para los animales mantenidos *ad libitum* durante ese período (Figura 4), que se hizo máximo tres h después de restablecer la alimentación (a las 21:00h; $+1.96\pm 0.66$ mg/dL; $P<0.01$). Además, de las pruebas realizadas Rest18h fue la que permitió obtener un menor error estándar para la diferencia entre los piensos (0.66 mg/dL). Estos resultados coinciden con los obtenidos en una prueba posterior (Boscolo-Bragadin *et al.*, 2016 y Tomás-Esteban *et al.*, 2016), en la que se determinó el PUN a 432 conejos de engorde de 47 días de vida, a las 08:00h (sistema Diario) y a las 21:00h (sistema Rest18h). A las 21:00h los animales tuvieron una mayor PUN ($+8.36$ mg/dL) que a las 08:00 h, aunque el coeficiente de variación de dichas determinaciones fue similar (1.27 y 1.41%, respectivamente).

Conclusiones

A la vista de estos resultados se puede concluir que el nivel del PUN es un indicador adecuado para detectar deficiencias en aminoácidos en piensos de conejos de engorde. Las diferencias entre los piensos equilibrado y desequilibrado fueron máximas entre las 04:00h y 12:00h en conejos alimentados *ad libitum*, y a las tres horas de restablecer la alimentación (21:00h), tras un periodo de restricción alimentaria de diez horas, donde la variabilidad de dicha diferencia fue además la más baja de las registradas.

Por otra parte, el nivel de ingestión de pienso previo del animal afecta el nivel del PUN, pero su inclusión como covariable no tuvo un efecto significativamente relevante, por lo que no sería necesario el control del mismo.

Agradecimientos

Este estudio ha sido apoyado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) del Gobierno de España (AGL2014-53405-C2-1-P). También se agradece la beca concedida a Pablo Jesús Marín García del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU-2014-01203). Agradecer al grupo de alimentación del Instituto de Ciencia y tecnología animal todo su apoyo y dedicación.

Bibliografía

- Baselga, M. (2004). Genetic improvement of meat rabbits. Programmes and diffusion in proceedings of 8th World Rabbit Congress. Puebla. México.
- Bellier, R., Gidenne, T., Vernay, M., Colin, M. (1995). In vivo study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science, Research* 73,128-135.
- Blasco, A. (1989). Genética y nutrición del conejo. In C. de Blas Alimentación del conejo. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.
- Boscolo-Bragadin, C. (2016). Effect of dietary lysine, methionine, and threonine level in plasma urea nitrogen as an indicator of amino acid metabolic imbalance in rabbit feed. Graduate thesis. Università degli studi di Padova, 49pp.
- Brown, J.A., Cline, T.R. (1974). Urea Excretion in the pig: and indicator of protein quality and amino acid requirements. *Journal of Nutrition Research* 104, 542-545.
- Carabaño, R., Villamide, M.J., García, J., Nicodemus, N., Llorente, A., Chamorro, S., Menoyo, D., García-Rebollar, P., García-Ruiz, A.I., de Blas, J.C. (2009). New concepts and objectives for protein-amino acid nutrition in rabbits: a review. *World Rabbit Science Research* 17, 1-14.
- Carabaño, R., de Blas, C., García, A.I. (2000). Recent advances in nitrogen nutrition in rabbits. *World Rabbit Science Research* 8, 14–28.
- Cartuche, L., Pascual, M., Gómez, E.A., Blasco, A. (2014). Economic weights in rabbit mear production. *World Rabbit Science Research* 22, 165-177.
- Coma, J., Carrion, D., Zimmerman, D.R. (1995). Use of plasma urea nitrogen as a rapid response criterion to determine the lysine requirement of pigs. *Journal of animal science Research* 73, 472-481.
- de Blas, C., Astillero, R., Chamorro, S., Corujo, A., García-Alonso, J., García-Rebollar, P., García-Ruiz, I., Menoyo, D., Nicodemus, N., Romero C., Carabaño, R. (2007). Efectos de la nutrición y el manejo sobre el desarrollo de patologías digestivas de gazapos en un entorno de enteropatía epizoótica. XXIII Curso de especialización FEDNA, Madrid.

- de Blas, J.C., Gonzalez-Mateos, G. (2010). Feed Formulation. *En: de Blas C., Wiseman J. (eds). Nutrition of the Rabbit*. CABI Publishing. CAB International, Wallingford Oxon, UK, 222-232.
- FAO, STAT. (2013). Statistic data: food and agriculture organization. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569#ancr>
- Feki, S., Baselga, M., Blas, E., Cervera, C. y Gomez, E.A. (1996). Comparison of growth and feed efficiency among rabbit lines selected for different objectives. *Livestock Production Science Research* 45, 87-92.
- Forbes, J.M. (1995). Specific nutrients affecting intake. *En: Forbes J.M. (eds). Voluntary feed intake and diet selection in farm animals*. CAB International, Wallingford Oxon, UK, 226-246.
- Fraga, M.J. (1998). Protein requirements. *In: de Blas, C. and Wiseman, J. (eds). The Nutrition of the Rabbit*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 133–143.
- Gidenne T., Lebas F., Fortun-Lamothe L. (2010). Feeding behavior of rabbits. *En: de Blas C., Wiseman J. (eds). Nutrition of the Rabbit*. CABI Publishing. CAB International, Wallingford Oxon, UK, 233-252.
- Hirakawa, H. (2001). Coprophagy in leporids and other mammalian herbivores. *Mammal Review* 31, 61–80.
- Kivi, J.T. (2000). Amino acids. *In: Food analysis by HPLC*. Marcel Dekker New York.
- Lenehan, N.A., Dritz, S.S., Tokach, M.D., Goodband, R.D., Nelssen, J.L., Usry, J.L. (2003). Effects of lysine level fed from 10 to 20 kg on growth performance of barrows and gilts. *J Anim Sci. Research* 81(1),46.
- Marín-García, P.J., Blas, E., Cervera, C., Pascual, J.J. (2016a). Effects of the animal breeding about growth rate on nutritional parameters in rabbits. *World Rabbit Congress*. Quindago, China.
- Marín-García, P.J., Blas, E., Cervera., C. Pascual, J.J. (2016b). A deficient protein supply could be affecting selection for growth rate in rabbits. *Annual Meeting of the European Federation of Animal Science*. Belfast, UK.
- Maertens, L. (2009). Possibilities to reduce the feed conversion in rabbit production. *In: Proceedings Giornate di Coniglicoltura*. ASIC, Forli, Italy. 1–10.
- Romero, C., Nicodemus, N., García-Rebollar, P., García-Ruiz, A.I., Ibáñez, M.A. and de Blas, J.C. (2009). Dietary level of fibre and age at weaning affect the proliferation of *Clostridium perfringens* in the caecum, the incidence of epizootic rabbit enteropathy and the performance of fattening rabbits. *Animal. Feed Science and Technology Research* 153, 131–140.
- SAS Institute. (2002). *SAS/STAT® User's Guide (Release 9.2)*. SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.
- Tomás-Vidal, A. (2016). Efecto de la ingestión de lisina, metionina y treonina sobre el nitrógeno ureico plasmático como indicador de desequilibrios aminoacídicos en Conejos de engorde. *Master's thesis*. Universidad Politécnica de Valencia. 17pp.
- Trocino, A., García, J., Carabaño, R., Xiccato, G. (2013). A meta-analysis on the role of soluble fibre in diets for growing rabbits. *World. Rabbit Sci.*, <http://dx.doi.org/10.4995/wrs.2013.1285>.
- Villamide, M.J., Carabaño, R., Maertens, L., Pascual, J., Gidenne, T., Falcão e Cunha, L. and Xiccato, G. (2009). Prediction of the nutritional value of European compound feeds for rabbits by chemical components and in vitro analysis. *Animal Feed Science and Technology* 150, 283–294.