RESPUESTA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL AL ESTRÉS POR CALOR EN DOS LÍNEAS MATERNAS DE CONEJO CON DIFERENTE LONGEVIDAD

El estrés térmico afecta de forma negativa a la productividad y la salud del conejo, subrayando la importancia de disponer de líneas de conejos resilientes al estrés térmico. Así, en la cunicultura, igual que en otras especies ganaderas, los objetivos de selección están cambiando progresivamente. Los programas de mejora ya no se centran exclusivamente en caracteres relacionados con la eficiencia productiva, sino que incorporan cada vez más caracteres funcionales, como la longevidad y la resiliencia, debido al impacto positivo que tienen tanto en la rentabilidad económica como en el bienestar animal.

BIADA I.[1*], IBÁÑEZ-ESCRICHE N.[1], GARCÍA M.L.[2], ARGENTE M.J.[2], SANTACREU M.A.[1]

[1]Institute for Animal Science and Technology, Universitat Politècnica de València
[2]Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Universidad Miguel Hernández de Elche

La longevidad y la resiliencia son caracteres difíciles de mejorar mediante selección clásica debido a su baja heredabilidad, su expresión tardía y la necesidad de un fenotipado costoso a largo plazo. En la Universidad Politécnica de Valencia se aborda un enfoque innovador basado en el estudio de la microbiota intestinal como marcador biológico de la longevidad y resiliencia que vincula la genética del huésped con el estado de salud y la respuesta de los animales a los desafíos ambientales a los que están expuestos.

El estrés térmico afecta significativamente a la productividad y la salud del ganado, especialmente en el Mediterráneo dónde debido al cambio climático están subiendo las temperaturas (Ebeid *et al*., 2023). Los conejos por su denso pelaje y limitada sudoración son especialmente vulnerables al estrés térmico (Dalmau *et al*., 2014). El estrés térmico afecta negativamente a los caracteres reproductivos, disminuyendo la fertilidad y el tamaño de la camada (Ebeid *et al*., 2023). También afecta a los caracteres de crecimiento, como el peso corporal y la tasa de crecimiento (Zeferino *et al*., 2013). Estos efectos adversos subrayan la importancia de disponer de líneas resilientes al estrés térmico para mejorar la sostenibilidad de la cunicultura en condiciones climáticas cambiantes.

El estrés térmico afecta a la microbiota intestinal, que sabemos que está relacionada con la longevidad y la salud de los conejos (Gerber, 2014). El estrés térmico altera la composición y diversidad microbiana en cerdos, aves y conejos (He *et al*., 2021; Bai *et al*., 2021), causando disbiosis y reduciendo la producción de ácidos grasos de cadena corta, que son fundamentales para la salud intestinal e inmunitaria (Priyadarshini *et al*., 2018). En situaciones de estrés la integridad de la barrera intestinal se ve comprometida, permitiendo la entrada de sustancias dañinas al organismo, lo que provoca inflamación y enfermedades (He *et al*., 2021). Además, algunos microorganismos son particularmente sensibles al estrés térmico y podrían utilizarse como biomarcadores para evaluar su impacto en la salud, crecimiento y productividad en conejo (He *et al*., 2021; Bai *et al*., 2021).

En la UPV se dispone de dos líneas maternas con diferente longevidad y en este estudio se parte de la hipótesis de que el estrés térmico afecta a la composición y diversidad de la microbiota intestinal de forma diferente en función de la línea. Perfiles microbianos distintos indicarían diferencias en los mecanismos fisiológicos y en la regulación de respuesta al estrés térmico entre las líneas genéticas. Por lo tanto, el objetivo es estudiar el efecto de las condiciones térmicas sobre la diversidad y la composición microbiana de dos líneas maternas de conejo con diferente longevidad, la línea A y la línea LP, para identificar posibles biomarcadores y mecanismos de resiliencia al estrés por calor.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron 199 conejas nulíparas de dos líneas maternas comerciales con diferente longevidad, líneas A y LP. Se estudiaron dos condiciones térmicas a partir de los valores del índice de temperatura-

humedad (THI): periodo de estrés por calor (THI: 25.7 ± 1.2) y periodo de confort térmico (THI: 17.5 ± 1.7). La línea A incluyó 98 conejas (47 en estrés térmico y 51 en confort), y la línea LP, 101 conejas (50 en estrés térmico y 51 en confort). La línea LP se fundó con criterios de longevidad y productividad, concretamente a partir de hembras con un número medio de partos de 30 (Sánchez *et al*., 2008). La línea A es una línea materna comercial de longevidad estándar que se fundó a partir de un muestreo de conejas New Zealand White criadas por granjeros cerca de Valencia, España (Sánchez *et al*., 2008). Durante la primera semana posparto del primer parto, se recolectaron muestras de heces blandas del ano y se congelaron. El ADN de las heces se extrajo utilizando el kit HigherPurity Stool DNA Isolation. El gen 16S rRNA fue amplificado (regiones V3-V4) y secuenciado en una plataforma Illumina MiSeq. El análisis bioinformático incluyó el filtrado de calidad con fastp, la eliminación de quimeras y el procesamiento con DADA2 para obtener variantes de secuencia de amplicones (ASVs). A continuación, se hizo la clasificación taxonómica con la base de datos Silva y el análisis en la plataforma QIIME2. Se calcularon los índices de diversidad alfa (riqueza, índice de Shannon y uniformidad de Pielou) y se analizaron de forma bayesiana con un modelo lineal que incluía los factores de línea genética, condición térmica y la interacción entre ambos. La diversidad beta fue evaluada mediante matrices de disimilitud de Aitchison, análisis de componentes principales (PCA) y pruebas PERMANOVA para determinar los efectos de los factores línea genética y condición térmica en la composición microbiana.

Se utilizaron los modelos Random Forest, BayesC y Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) para predecir en base a la información de la microbiota de cada muestra, la línea genética (A y LP) y la condición térmica (confort térmico y estrés térmico por calor). Se emplearon dos subconjuntos de datos, el subconjunto 1 incluía muestras únicamente del periodo de estrés térmico (97 muestras) y el subconjunto 2 con muestras del periodo de confort térmico (102 muestras). Para la clasificación de las líneas en base al microbioma se siguió el procedimiento propuesto por Topçuoğlu *et al.* (2020) con algunas modificaciones. El rendimiento del modelo se evaluó mediante el área bajo la curva ROC (AUC).

¿Sabías que...?

La microbiota más estudiada es la microbiota intestinal y sus principales funciones son: ayudar a digerir alimentos, fabricar compuestos bioactivos como algunas vitaminas, eliminar compuestos tóxicos, proteger contra patógenos, mantener la barrera intestinal y fortalecer el sistema inmune.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a la diversidad alfa (diversidad dentro de las muestras), la línea LP, que es la más longeva, mostró mayor diversidad que la línea A para los tres índices de diversidad alfa analizados. Las diferencias fueron relevantes para los índices Shannon y riqueza observada (probabilidad de que la diferencia sea mayor que cero ≥ 80% y diferencia media en unidades de desviación estándar > 1/3). Respecto al efecto de la condición térmica, la diversidad alfa aumentó durante el periodo de estrés por calor en comparación con el periodo de confort térmico, las diferencias fueron relevantes para todos los índices estudiados. En condiciones de confort térmico, la línea LP presentó mayor riqueza del microbioma que la línea A, pero en condiciones de estrés térmico, no se encontraron diferencias relevantes entre líneas para ninguno de los tres índices de diversidad alfa. Para la diversidad beta, los análisis PERMANOVA revelaron que la condición térmica explicaba el mayor porcentaje de disimilitud total (2.3%, p = 0.000), seguida del efecto de la línea (1.7%, p = 0.000) y la interacción (0.8%, p = 0.001). El análisis PCA mostró una separación de comunidades bacterianas en función de la condición térmica (**Figura 1.a**; 9% de la varianza total) y en función de la línea (**Figura 1.b**; 5% de la varianza total).

Los resultados de diversidad indicaron un importante efecto del estrés por calor en las líneas maternas de conejos estudiadas. El estrés térmico aumentó la diversidad alfa en ambas líneas y provocó cambios en la diversidad beta,

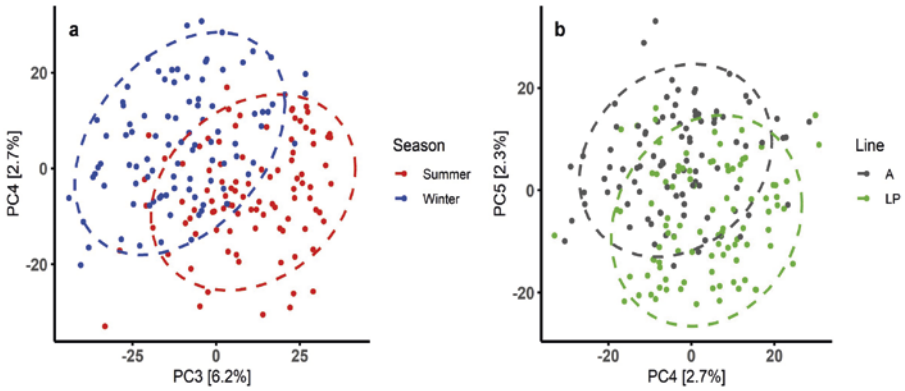


Figura 1.
Disimilitud entre muestras (basada en la distancia de Aitchison) por condición térmica (a.) y por línea (b). PC3, PC4, PC5 y PC6: Tercer, cuarto, quinto y sexto componente principal, respectivamente.

LA MICROBIOTA ES EL CONJUNTO DE MICROORGANISMOS VIVOS QUE VIVEN DE MANERA NATURAL Y SIMBIÓTICA EN DISTINTOS TEJIDOS Y ÓRGANOS DE LOS SERES VIVOS

probablemente debido a la disrupción de la barrera intestinal, lo que podría facilitar la proliferación de patógenos (He *et al*., 2021). La línea más longeva y robusta, línea LP, mostró mayor riqueza del microbioma bajo confort térmico pero las diferencias de diversidad entre líneas se redujeron bajo condiciones de estrés por calor. Estos resultados podrían deberse a una mayor proliferación de patógenos en la línea A que es la menos longeva.

En los tres modelos (PLS-DA, BayesC y Random Forest), la predicción de la línea basada en los datos del microbioma fue más eficaz bajo condiciones de estrés térmico, con un AUC medio de 0,96 ± 0,03 en comparación con un AUC medio de 0,91 ± 0,06 en condiciones de confort térmico. Esto sugiere que la microbiota de las dos líneas de conejos difiere más en condiciones de estrés térmico. El estudio de la diferencias taxonómicas y filogenéticas a partir de las variables con mayor poder de discriminación confirmó este patrón, revelando qué los taxones clave para predecir las líneas eran diferentes dependiendo de las condiciones térmicas, y que la mayoría de las variables importantes eran exclusivas del estrés térmico o del confort térmico, con poco solapamiento entre las dos condiciones térmicas (**Figura 2**). En concreto, los taxones asociados con variaciones en el estrés térmico incluían los géneros *Erysipelatoclostridium* y *Monoglobus*, así como la familia Lachnospiraceae, los cuales eran más abundantes en la línea de menor longevidad (A). En contraste, todos los ASV más abundantes en la línea de mayor longevidad (LP) pertenecían exclusivamente a la familia Eubacteriaceae. Los géneros de *Erysipelatoclostridium* están relacionados con niveles elevados de cortisol, respuesta al estrés y trastornos metabólicos (Kaakoush, 2015). De *Monoglobus* se sabe que favorece la salud inmunitaria, pero puede aumentar el amoníaco en sangre, comprometiendo la integridad intestinal y favoreciendo la inflamación (Sakurai *et al*., 2022).

El conjunto de resultados indica una respuesta de la microbiota al estrés por calor y pone de manifiesto diferencias en la respuesta y adaptación al estrés de las dos líneas maternas estudiadas.

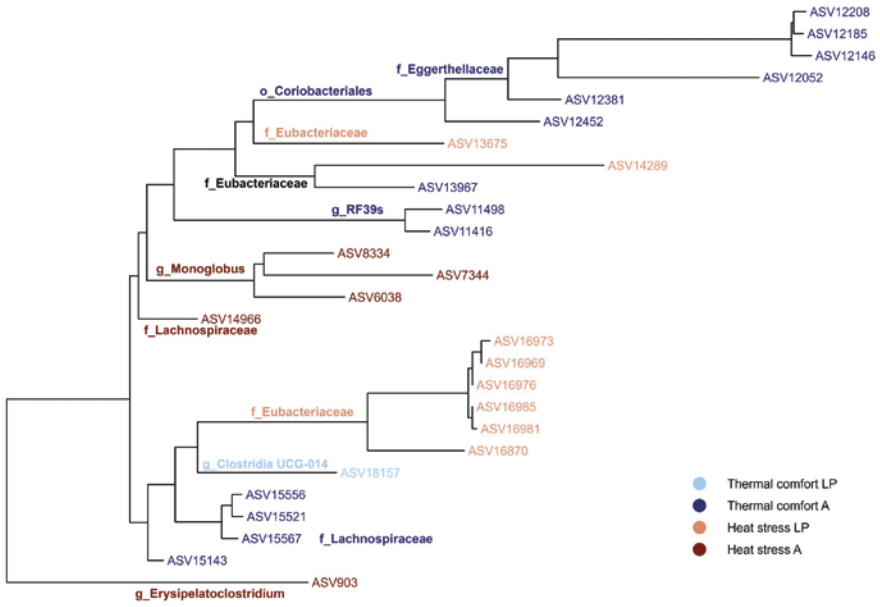


Figura 2.
Arbol filogenético de los ASV (Amplicon Sequence Variant) seleccionados por tres métodos, random forest, BayesC y PLS-D, para discriminar las líneas genéticas bajo las dos condiciones térmicas, confort (azul oscuro para la línea A y azul claro para la línea LP) y estrés por calor (rojo para la línea A y naranja para la línea LP).

A modo de conclusión

El estrés térmico altera la diversidad del microbioma intestinal en líneas maternas de conejos, aumentando la diversidad alfa y cambiando la diversidad beta posiblemente debido a la alteración de la barrera intestinal. El aumento de la diversidad alfa en la línea A durante el estrés térmico podría sugerir una posible mayor proliferación de patógenos. En particular, los taxones potencialmente asociados al estrés térmico, como *Erysipelatoclostridium* y *Monoglobus*, fueron más abundantes en la línea menos longeva A, lo que sugiere respuestas reguladas por el microbioma específicas de cada línea al estrés ambiental y apoya la mayor longevidad y resiliencia de la línea LP.

Los resultados obtenidos muestran el potencial de la microbiota fecal como biomarcador de resiliencia al estrés térmico en conejos y apoyan el interés de estudiar su posible uso en los programas de mejora genética. Asimismo, ponen de relieve la importancia de las interacciones entre factores genéticos y ambientales en la composición de la microbiota, lo que ayudará al desarrollo de estrategias futuras para proteger la salud animal frente al estrés climático.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte del programa AGROALNEXT y contó con el apoyo de MCIN con financiación de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y de la Generalitat Valenciana (AGROALNEXT 2022/037). A la Generalitat Valenciana por la beca CIACIF/2021/005, y a Tamara Romero Rueda y Rafael Torres Lozano por su apoyo en la recolección de muestras y manejo de animales.

BIBLIOGRAFÍA

Queda a disposición del lector interesado en el correo electrónico del autor: ibiada@posgrado.upv.es

CUNISER®

REGRESA

EL LÍDER EN FERTILIDAD



Único desarrollado exclusivamente para conejas

- Induce, estimula y sincroniza el ciclo estral.
- Favorece la fertilidad.
- Impacta sobre índices productivos.
- Dosis precisa, fácil de aplicar y sin errores.

DISTRIBUIDOR EXCLUSIVO

Covegan
www.covegan.es

Biogénesis Bagó

CUNISER®. Gonadotrofina Sérica altamente purificada (eCG/PMSG), como polvo liofilizado y disolvente para su reconstitución. COMPOSICIÓN: en todos los casos, la concentración final tras la reconstitución completa es de 25 UI/ 1 mL. CUNISER 500: vial 500 UI de eCG/PMSG polvo liofilizado. Vial 20 mL disolvente (PBS). CUNISER 5000: vial 5.000 UI de eCG/PMSG polvo liofilizado. Vial 200 mL disolvente (PBS). ESPECIE DESTINO: conejas reproductoras. INDICACIONES: Inducción y sincronización del estro. VÍA DE ADMINISTRACIÓN: Intramuscular o subcutánea. POSOLOGÍA Y RECOMENDACIONES DE USO: 25 UI/animal, equivalente a 1 mL de la dilución final. Administrar en dosis única 48 horas antes de la inseminación artificial o servicio natural dirigido. TIEMPO DE ESPERA: 0 días. PERÍODO DE VALIDEZ: 24 meses. CONSERVACIÓN: nevera entre 2 y 8 °C. Mantener el vial liofilizado protegido de la luz solar. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS: manipular con cuidado y bajo supervisión de un veterinario. Es muy recomendable el uso de guantes de látex. No se recomienda su manipulación por mujeres embarazadas. Mantener fuera del alcance de los niños. Titular de las licencias BIOGENESIS GLOBAL SL (BIOGENESIS BAGO). Licencias: 1734 ESP y 1736 ESP (España). Medicamento sujeto a prescripción veterinaria. Exclusivo de uso veterinario.