



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y
DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

EFFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN CON *Bacillus subtilis* SOBRE POBLACIONES
BACTERIANAS Y ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES, EN CONTENIDO CECAL Y
CECOTROFOS DE CONEJOS CANULADOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
CARMEN ALDONZA NÚÑEZ GRACIA

COMITÉ TUTOR

CARLOS GUTIÉRREZ OLVERA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, U.N.A.M.

ADRIANA MARGARITA DUCOING WATTY
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, U.N.A.M

MARIO ANTONIO COBOS PERALTA
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

MÉXICO, D. F. DICIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Orden <i>Lagomorpha</i>	1
1.2 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	1
1.3 Particularidades alimenticias y nutricias del conejo doméstico	2
1.4 Anatomía y fisiología del tracto gastrointestinal del conejo doméstico	3
1.4.1 Cecotrofia	13
1.4.2 Maduración del tracto gastrointestinal del conejo doméstico	13
1.5 Desórdenes digestivos	14
1.6 Canulación en conejo doméstico	15
1.7 El uso de probióticos en la alimentación animal	16
1.7.1 Efectos benéficos de los probióticos en intestino	17
1.7.2 Uso de probióticos en la alimentación del conejo doméstico	19
1.8 El género <i>Bacillus</i> como probiótico	19
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo General	22
4.2 Objetivos Específicos	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 Características de la cánula desarrollada	23
5.2 Unidades experimentales	24

5.2.1 Periodo de Adaptación	24
5.3 Procedimiento quirúrgico	24
5.4 Tratamientos	26
5.5 Muestreos	27
5.6 Procesamiento de muestras	29
5.6.1 Determinación de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)	29
5.6.2 Determinación de Bacterias Totales (BT)	30
5.6.3 Determinación de Bacterias Celulolíticas (BC)	30
5.7 Parámetros Productivos	
5.7.1 Consumo de alimento	31
5.7.2 Ganancia de peso	32
5.7.3 Conversión alimenticia	31
5.7.4 Rendimiento en canal	31
5.8 Análisis estadístico	
5.7.1 Determinaciones en contenido cecal	32
5.7.2 Determinaciones en cecotrofos	33
5.7.3 Parámetros productivos	
5.7.3.1 Ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia	33
5.7.3.2 Rendimiento en canal	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1 Cánulas	35
6.2 Ácidos grasos volátiles	
6.2.1 Contenido cecal	37
6.2.2 Cecotrofos	39
6.3 Bacterias totales	

6.3.1 Contenido cecal	43
6.3.2 Cecotrofos	43
6.4 Bacterias celulolíticas	45
6.5 Ganancia de peso	46
6.6 Consumo de alimento	47
6.7 Conversión alimenticia	49
6.8 Rendimiento en canal	50
7. CONCLUSIONES	51
8. REFERENCIAS	52

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Relación entre edad y valor de pH gástrico en gazapos	5
CUADRO 2. Principales especies que componen la microbiota cecal del conejo doméstico	8
CUADRO 3. Principales ácidos grasos volátiles producidos por la microbiota cecal del conejo doméstico	9
CUADRO 4. Concentración promedio de ácidos grasos volátiles en contenido cecal de conejos canulados por tratamiento	37
CUADRO 5. Concentración promedio de ácidos grasos volátiles en contenido cecal de conejos canulados por tratamiento por tiempo	38
CUADRO 6. Concentración promedio de ácidos grasos volátiles en cecotrofos de conejos canulados por tratamiento	39
CUADRO 7. Concentración promedio de ácidos grasos volátiles en cecotrofos de conejos canulados por tratamiento por tiempo	40
CUADRO 8. Concentración promedio de bacterias totales en contenido cecal y cecotrofos de conejos canulados por tratamiento	44
CUADRO 9. Concentración promedio de bacterias totales en contenido cecal y cecotrofos de conejos canulados por tratamiento por tiempo	44
CUADRO 10. Pesos promedio de conejos canulados por tratamiento	47
CUADRO 11. Consumo de alimento diario promedio por conejo canulado por tratamiento por semana	48
CUADRO 12. Comparación del consumo de alimento por día por individuo	48
CUADRO 13. Conversión alimenticia promedio de conejos canulados por tratamiento	49
CUADRO 14. Comparación de la conversión alimenticia semanal de conejos no canulados y canulados a nivel de la 13 ^{ava} asa cecal	49
CUADRO 15. Rendimiento en canal promedio de conejos canulados por tratamiento	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Familias y géneros del orden <i>Lagomorpha</i>	1
FIGURA 2. Tubo gastrointestinal del conejo doméstico	4
FIGURA 3. Sustratos y productos de la fermentación cecal del conejo	8
FIGURA 4. Organización del tejido linfoide digestivo	12
FIGURA 5. Localización de tejido linfoide asociado	12
FIGURA 6. Dimensiones de la cánula de policloruro de vinilo con tapón de etilvinilacetato	23
FIGURA 7. Coneja con collarín isabelino	28
FIGURA 8. Obtención de muestra de contenido cecal	28
FIGURA 9. Obtención de muestra de cecotrofos	28
FIGURA 10. Cánulas <i>in situ</i>	35
FIGURA 11. Relación entre el establecimiento de microbiota cecal y producción de ácidos grasos volátiles de conejos en crecimiento	41

RESUMEN

Alrededor de la etapa de destete se observa una alta incidencia de trastornos digestivos en conejos en crecimiento. La necesidad de alternativas al uso de antimicrobianos utilizados para limitar la ocurrencia de estos trastornos, aparece después de la prohibición en Europa de su utilización en la nutrición animal. Una de estas alternativas son los probióticos. Con el fin de estudiar el efecto de *Bacillus subtilis* como probiótico sobre la actividad fermentativa cecal en el conejo vivo, fue necesario desarrollar una cánula y una técnica de canulación mediante la cual se pudieran obtener muestras representativas de material cecal con mínima perturbación en el funcionamiento normal del ciego por un largo tiempo. Se utilizaron 20 conejos hembra de la raza Nueva Zelanda canuladas a los 28 días de edad; éstas se distribuyeron aleatoriamente a uno de los 4 grupos experimentales, conformándose de 5 animales cada uno. Los grupos uno (T1) y dos (T2) recibieron *B. subtilis* por vía oral a una dosis de 24×10^8 UFC/d; los grupos tres (T3) y cuatro (T4) recibieron un placebo. Se utilizaron collares isabelinos en los grupos T2 y T4 para obtener muestras de cecotrofos. Se obtuvieron valores de ácidos grasos volátiles, cuenta de bacterias totales (BT) y bacterias celulolíticas (BC) a partir de las muestras de contenido cecal y cecotrofos. Además, se evaluaron las variables productivas (consumo voluntario, ganancia diaria de peso, conversión alimenticia y rendimiento en canal). No se encontró efecto del uso de *B. subtilis* en las variables, excepto para BT ($p < 0.01$). El comportamiento fisiológico (excepto para BC) y el rendimiento productivo fueron similares a lo reportado para los conejos no canulados. La cánula se mantuvo 49 días, facilitando los estudios a largo plazo, pero se requiere más investigación sobre su efecto sobre otras variables de fermentación.

Palabras clave: conejo; probiótico; *Bacillus subtilis*; cánula cecal; canulación cecal; ácidos grasos volátiles

ABSTRACT

A high incidence of digestive diseases is observed in growing rabbits, particularly around the weaning. The need for alternatives to anti-microbial agents used to limit the occurrence of these digestive disorders, appears after the European ban of its use in animal nutrition. One of these alternatives are probiotics. In order to study the effect of *Bacillus subtilis* as probiotic on the caecal fermentative activity in the live rabbit, it was necessary to develop a cannula and a cannulation technique, whereby representative samples of caecal material could be obtained, with minimal disturbance in the normal functioning of the caecum for a long period of time. 20 New Zealand White rabbits were used. Forming four experimental groups of 5 each, at 28 days of age were cannulated. Group one (T1) and two (T2) received *B. subtilis* orally at a dose of 24×10^8 CFU/d; group three (T3) and four (T4) received a placebo. T2 and T4 groups, were provided with a neck collar in order to obtain cecotrophs samples. Volatile fatty acids, total bacterial count (TB) and cellulolytic bacteria (CB) values from caecal content and cecotrophs samples were obtained. Also, productive variables (voluntary intake, daily weight gain, feed conversion and slaughter rate) were assessed. There was no effect of *B. subtilis* use on the variables except for TB ($p < 0.01$). Physiological behavior (except for CB) and productive performance were similar to that reported for non-cannulated rabbits. The cannula remained 49 days, thus facilitating long-term studies, but further investigation about its effect on other fermentation variables is required.

Keywords: rabbit; probiotic; *Bacillus subtilis*; caecal cannula; caecal cannulation; volatile fatty acids

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Orden *Lagomorpha*

El orden *Lagomorpha* agrupa a todas las especies de liebres, conejos y pikas, pequeños mamíferos herbívoros que se distribuyen alrededor del mundo. Anteriormente, estas especies eran clasificadas dentro del orden *Rodentia*, sin embargo, dadas las diferencias anatómicas con los roedores, se separaron creando así el orden *Lagomorpha* en 1912 (Alves *et al.*, 2008). De acuerdo a la revisión de Hoffmann y Smith de 2007, el orden agrupa 91 especies de las cuales 32 son liebres, 29 de conejos y 30 de pikas; en la figura 1 se pueden observar los géneros que comprenden las dos familias del orden *Lagomorpha*.

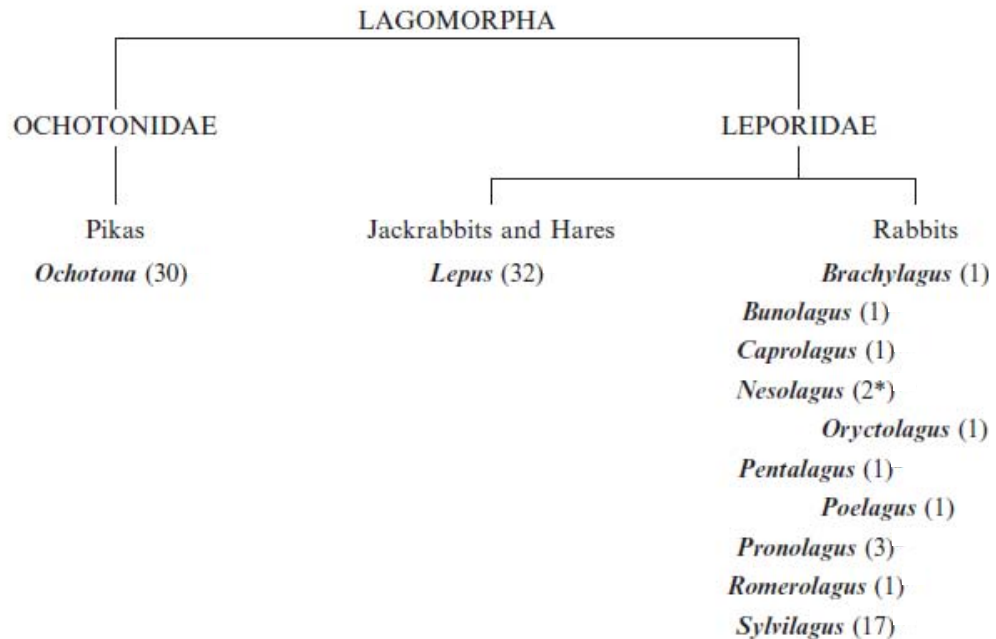


Figura 1. Familias y géneros del orden *Lagomorpha*
(Alves *et al.*, 2008)

1.2. *Oryctolagus cuniculus*

El género *Oryctolagus* es monotípico, es decir, sólo incluye a una especie conocida comúnmente como conejo europeo, siendo el lagomorfo con mayor distribución en el

mundo debido a su domesticación, de ahí que también se conozca como conejo doméstico. *Oryctolagus cuniculus* es utilizado como fuente de alimento, como mascota y como animal de laboratorio para experimentación médica y pruebas de constatación de fármacos (Alves *et al.*, 2008).

1.3. Particularidades alimenticias y nutricias del conejo doméstico

Esta especie presenta características anatómicas y fisiológicas peculiares, muchas de las cuales comparte con los demás lagomorfos distinguiéndolos de entre los mamíferos; dentro de las más representativas se encuentran la presencia de un par accesorio de incisivos superiores, la forma característica del labio superior con una hendidura en forma de “Y” invertida (labio leporino) y por realizar el proceso de la cecotrofia (Davies y Davies, 2003; Mora-Valverde, 2010).

De acuerdo a sus hábitos alimenticios (Van Soest, 1980), el conejo doméstico es clasificado como herbívoro fermentador posgástrico, selector de concentrados, ya que su dieta en vida libre se basa en vegetación suculenta; sin embargo, cabe destacar que su talla pequeña y correspondiente alto rango metabólico, obligan a la especie a sortear su supervivencia como presa de otros mamíferos, teniendo que cubrir sus elevados requerimientos energéticos con el consumo de estas dietas bajas en energía (Davies y Davies, 2003). Para hacer frente a esta situación (Davies y Davies, 2003 y Carabaño *et al.*, 2010), el conejo desarrolló un tubo gastrointestinal radicalmente diferente a otras especies domésticas de herbívoros, que le permite:

- ✓ Un elevado consumo de alimento ($65\text{--}80\text{ g/kg}^{-1}$ de peso vivo), y por ende, de energía y proteína;
- ✓ La separación de los componentes digeribles y fácilmente fermentables de la dieta;
- ✓ La eliminación rápida de las partículas fibrosas y lentamente fermentables.

Estas ventajas se deben a la característica fisiología digestiva, común a todos los lagomorfos, que permite la separación de las partículas de desecho (heces verdaderas) de los productos de la fermentación cecal; éstos junto con algunas bacterias, son absorbidos en el intestino delgado por medio de la cecotrofia. Con esta reingestión, se prescinde de la necesidad de contar con una amplia superficie de absorción en el intestino (Davies y Davies, 2003; Mora-Valverde, 2010). De ahí la importancia de la actividad microbiana del ciego para los procesos de digestión y control de diversas patologías, considerándose incluso la vía más importante para la utilización general de los nutrientes por el conejo (Carabaño *et al.*, 2010).

1.4. Anatomía y fisiología del tubo gastrointestinal del conejo doméstico

A continuación, se describen las particularidades anatómicas y fisiológicas del tubo gastrointestinal (TGI) del conejo, el cual se puede apreciar esquemáticamente en la figura 2.

Cavidad Oral

El conejo localiza su alimento por medio de las vibrisas que se encuentran en los labios, ya que debido a la posición de los ojos, no es posible que haga contacto visual directo con el alimento enfrente de la boca, además, sus labios son sumamente móviles. Como se mencionó, los conejos en vida libre son folívoros ya que seleccionan las plantas más suculentas, prensándolas y cortándolas con sus incisivos de forma característica de cincel, facilitando su ingestión por el largo diastema y la hendidura del labio superior. Una vez ingerido el alimento, es molido por los premolares y molares coordinándose con movimientos de la lengua; se han reportado 120 movimientos mandibulares por minuto subsecuentes a la ingestión de alimento fresco, pero en el caso de la ingestión de cecotrofos, éstos son deglutidos inmediatamente después de su ingestión, sin ser masticados. La cavidad oral del conejo posee cuatro pares de glándulas salivares mayores

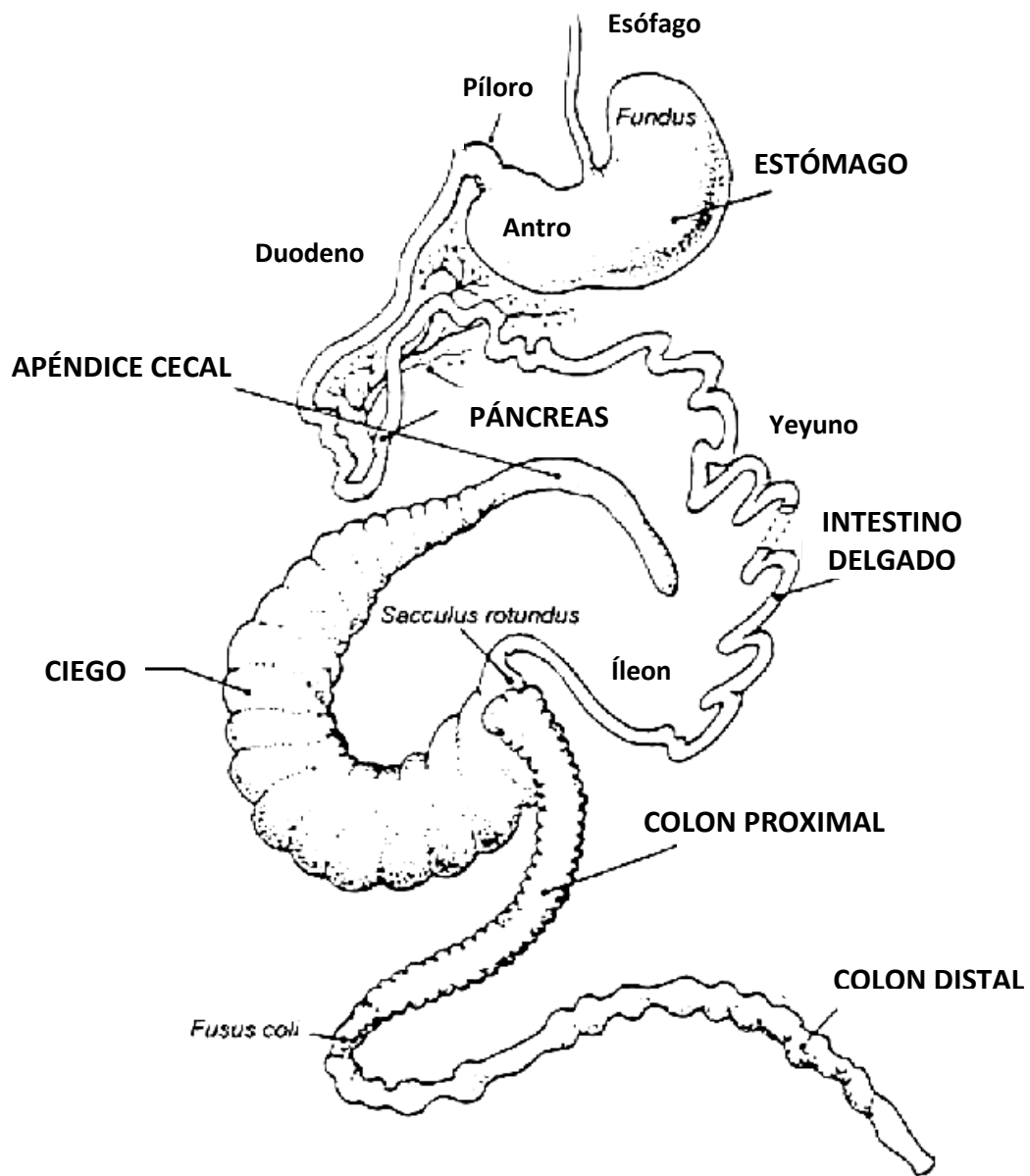


Figura 2. Tubo gastrointestinal del conejo doméstico
(Lebas, 1997)

(parótida, mandibular, sublingual y zigomática); la saliva contiene amilasa y galactosidasa, producidas por las glándulas mandibulares; también se pueden encontrar cantidades traza de lipasa, urea, potasio y bicarbonatos (Davies y Davies, 2003).

Estómago

La literatura reporta que este órgano representa entre el 15% y el 34% del volumen total del tubo gastrointestinal mencionándose que nunca se encuentra vacío, pues se ha observado que después de un ayuno de 24 horas el estómago de un conejo adulto se encuentra al 50% de su capacidad (Carabaño *et al.*, 2010; Fortun-Lamothe y Gidenne, 2006; Davies y Davies, 2003).

En general, presenta una capa muscular muy delgada; el esfínter cardial está bien desarrollado, lo que impide el vómito y su pared es no glandular e inmóvil; el fundus es la principal porción secretora gracias a la acción de las células parietales y peptídicas que se encuentran en esa zona, y también funge como almacén de cecotrofos, razón por la cual el estómago está en constante actividad y el pH siempre tiende a la acidez; la región del píloro posee una pared muscular mucho más densa (Davies y Davies, 2003; Portsmouth, 1977; Carabaño *et al.*, 2010).

Una característica fisiológica importante del estómago del conejo es su pH, el cual disminuye con la edad (Martínez, 2004). Como se puede apreciar en el Cuadro 1, aproximadamente a las siete semanas de edad alcanza un valor que oscila entre 1.0 y 3.0, y durante la vida adulta sólo variará entre 1.0 y 1.5, por lo que puede ser considerado como un medio estéril.

CUADRO 1. RELACIÓN ENTRE EDAD Y VALOR DE pH GÁSTRICO EN GAZAPOS

EDAD (días)	pH
1 a 7	5
7 a 14	5 – 6.5
14 a 21	4 – 6.5
21 a 28	4 – 6.5
28 a 35	3 – 5
35 a 42	2 – 5
42 a 49	1 – 3

Martínez M.A., 2004

De esta forma, la mucosa gástrica constituye una barrera altamente eficiente contra infecciones potenciales, a tal grado, que incluso resulta difícil la inoculación experimental de microorganismos patógenos por vía oral (Martínez, 2004). Sin embargo, los valores del pH estomacal, también se ven influidos dependiendo de la región gástrica donde se mida, de la presencia o ausencia de cecotrofos y del tiempo de ingestión de alimento (Carabaño *et al.*, 2010); por ejemplo, Orengo y Gidenne en 2007 determinaron un pH de 1 a 2.5 en la región del cardias, en ausencia de heces blandas y después de 4 horas de la ingestión de alimento.

Esta barrera química en contra de microorganismos patógenos va adquiriéndose paulatinamente, por lo que antes de ser alcanzada, los gazapos son aún susceptibles de contraer infecciones digestivas (Martínez, 2004).

Al nacimiento, los gazapos lactantes poseen un pH alrededor de 5. La leche ingerida forma un cuajo semisólido, que gradualmente pasa al intestino delgado a lo largo de las 23.5 horas hasta la siguiente toma. La formación del cuajo, es gracias a la acción de una enzima tipo-renina; en otras especies, es de esperarse que la retención gástrica prolongada de este cuajo propicie la proliferación de bacterias, pero los gazapos tienen un tipo de protección en contra de este tipo de infecciones, dada por una sustancia conocida como “aceite de estómago” o “aceite de leche”, un producto de los ácidos grasos octaenólico y decaenólico con propiedades antimicrobianas. Incluso, si crecieran bacterias en el estómago del gazapo lactante, éstos poseen la protección materna dada por la inmunidad pasiva de los anticuerpos maternos. Estos factores mantienen el medio gástrico prácticamente estéril (Carabaño *et al.*, 2010).

Intestino Delgado

El intestino delgado del conejo tiene una longitud de aproximadamente 3 metros y de acuerdo a Nicodemus *et al.* en 2002, un pH cercano a 7; en él ocurre la secreción de bilis, enzimas digestivas y amortiguadores por las glándulas accesorias. Es precisamente en esta

porción en donde se lleva a cabo la mayor parte de la digestión y absorción de nutrientes contenidos en la ingesta, ya sea por transporte activo o pasivo, gracias a las secreciones anteriormente mencionadas (Davies y Davies, 2003; Carabaño *et al.*, 2010).

En la parte distal del ileon se encuentra una ámpula muscular denominada *sacculus rotundus*, que parece tener una función inmunológica y sólo se encuentra en lagomorfos. Una válvula ileocecal, retarda el flujo reverso al ileon y direcciona el quimo hacia el ciego vía el *sacculus rotundus* (Davies y Davies, 2003).

Intestino Grueso

El ciego del conejo es proporcionalmente el más grande de todos los mamíferos, representando del 40% al 60% del volumen total del TGI (Davies y Davies, 2003; Portsmouth, 1977), y se caracteriza por poseer una capa muscular delgada que le permite distenderse; por otro lado, Hernández-Sánchez y Cobos-Peralta (2001) reportaron ciegos con pesos de 157 gramos en el conejo adulto, mientras que el estudio de García *et al.* (2002) arrojó un peso de 200 g/kg^{-1} de materia seca (MS) dentro del ciego y un pH tendiente a la acidez (5.4–6.8). La porción final de este saco ciego es vermiforme y se le conoce como apéndice cecal, el cual funge como órgano linfoide además de secretar bicarbonatos y agua (Davies y Davies, 2003).

La importancia de este órgano radica en que es el sitio primario de retención de la ingesta, ya que es una cámara de fermentación constituida por una amplia variedad de especies de bacterias, protozoarios y levaduras (Cuadro 2); además de la ingesta, los mucopolisacáridos secretados por las células caliciformes, los nutrientes no absorbidos y las partículas de alimento no digeridas, sirven como sustrato para la microbiota y así llevar a cabo la fermentación cecal (Davies y Davies, 2003).

Se estima que el ecosistema cecal del conejo está compuesto por más de 40 géneros y cientos de especies, de las cuales sólo entre el 25 y 40% pueden ser cultivados *in vitro*, debido a sus precisos requerimientos de anaerobiosis y a las interacciones nutricionales

complejas que pueden ocurrir entre los mismos microorganismos. De ahí que actualmente para identificar y proveer de más información sobre las especies presentes, se estén aplicando técnicas de biología molecular (Carabaño *et al.*, 2006).

CUADRO 2. PRINCIPALES ESPECIES QUE COMPONEN LA MICROBIOTA CECAL DEL CONEJO DOMÉSTICO

BACTERIAS	LEVADURAS	PROTOZOARIOS
<i>Bacteroides spp</i>	<i>Saccharomyces guttulatus</i>	<i>Eutrichomastix spp</i>
<i>Endophorus spp</i>		<i>Enteromonas spp</i>
<i>Streptococcus spp</i>		<i>Retortamonas spp</i>
<i>Acuformis spp</i>		<i>Entamoeba cuniculi</i>
<i>Clostridium spp</i>		
<i>Peptococcus spp</i>		
<i>Fusobacterium spp</i>		

Carabaño *et al.*, 2006

La microbiota cecal fermenta los carbohidratos solubles, proteínas y lípidos que ingresan al ciego (Mora-Valverde, 2010), además de celulosa, xilanos y pectinas (Davies y Davies, 2003; von Engelhardt, *et al.*, 1998). Los productos de esta fermentación constituirán por un lado, las estructuras para las proteínas y enzimas de los mismos microorganismos, y por otro, nutrientes que serán utilizados por el conejo directamente (Davies y Davies, 2003).

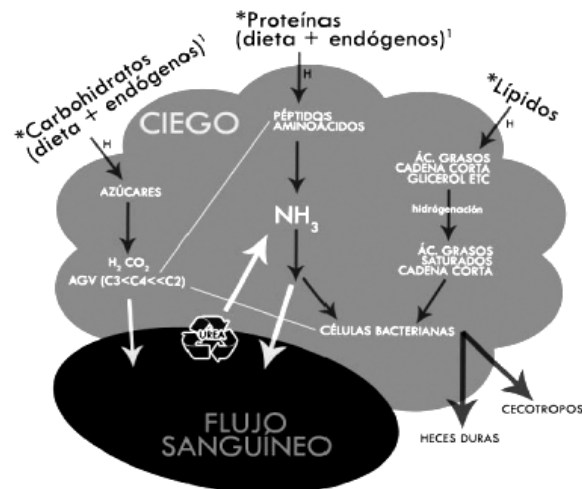


Figura 3. Sustratos y productos de la fermentación cecal del conejo (Mora-Valverde, 2010)

Tal como se puede observar en la figura 3, los productos de la degradación de los polisacáridos y sustratos endógenos como mucina, son los ácidos grasos de cadena corta (principalmente acetato, butirato y propionato) y que por sus características también son conocidos como ácidos grasos volátiles (Bergman, 1990; von Engelhardt, *et al.*, 1998; Davies y Davies, 2003; Mora-Valverde, 2010; Fortun-Lamothe y Gidenne, 2006); éstos son absorbidos en la mucosa cecal y colónica en su forma liposoluble para ser utilizados como fuente de energía por el conejo (von Engelhardt, *et al.*, 1998; Davies y Davies, 2003; Mora-Valverde, 2010). Los ácidos grasos volátiles, así como sus niveles en el contenido cecal, se pueden observar en el cuadro 3.

**CUADRO 3. PRINCIPALES ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES
PRODUCIDOS POR LA MICROBIOTA CECAL DEL CONEJO DOMÉSTICO**

ÁCIDO GRASO VOLÁTIL	CONCENTRACIÓN EN CONTENIDO CECAL
Acético	60 – 80 mmol//100mol
Butírico	8 – 20 mmol/100mol
Propiónico	3 – 10 mmol/100mol

García, et al., 2002

El perfil de ácidos grasos volátiles (AGV's) es específico no sólo para el conejo sino para todo el orden *Lagomorpha*, en el que el ácido acético es el más abundante, seguido del butírico a diferencia de lo reportado en otras especies de herbívoros fermentadores (von Engelhardt, *et al.*, 1998), dejando en tercer lugar al propiónico. También se encuentran, aunque en menor proporción, los ácidos valérico, isovalérico y láctico (Carabaño *et al.*, 2006 y 2010).

De acuerdo a Bergman (1990), el patrón de fermentación bacteriana presenta una variación diurna, en la cual se disminuye la concentración de los AGV's hasta en un 25% durante el periodo de eliminación de las heces duras en comparación con el momento de la cecotofia, en el cual las concentraciones son más altas.

Las proteínas y aminoácidos se fermentan hasta producir amoníaco (NH₃) el cual se absorbe junto con los AGV's, mientras que los lípidos son utilizados por la microbiota

(Mora-Valverde, 2010; Davies y Davies, 2003). Aunado a lo anterior, las bacterias cecales también son productoras de vitaminas del complejo B y K (Carabaño *et al.*, 2010).

El pH cecal y las concentraciones de AGV's son las variables clásicas que caracterizan el patrón de fermentación cecal, y dado que existe una relación entre ambas variables, constituyen un estimado indirecto de la actividad microbiana cecal, por lo que cambios en estas características se relacionan directamente con patrones de alimentación, el tipo de dieta -sobre todo con el consumo de fibra- y al mismo tiempo con el estado de salud del animal (García *et al.*, 2002).

Debido a que el ciego se sitúa en un punto posterior a los principales sitios de absorción de los nutrientes, el contenido cecal con los metabolitos generados en esta cámara fermentativa y algunos microorganismos, no pueden ser asimilados y se desechan a través del recto, por lo que para aprovechar estos nutrientes la especie desarrolló una estrategia alimenticia denominada cecotrofia (Fortun-Lamothe y Gidenne, 2006; Hernández-Sánchez y Cobos-Peralta, 2001).

El colon del conejo se puede dividir anatómica y fisiológicamente en dos porciones: colon proximal con una longitud de 35 cm, y colon distal con 80 – 100 cm de longitud (Davies y Davies, 2003; Carabaño *et al.*, 2010).

A su vez, el colon proximal puede ser dividido en tres segmentos: el primero posee tres tenias con haustras entre ellos; el segundo segmento tiene una sola tenia que cubre la mitad de la circunferencia del tubo digestivo; por último, el tercer segmento o también conocido como *fusus coli*, no tiene tenias o haustras, pero es una porción muscular que se encuentra densamente innervada, ya que funge como marcapasos de las ondas peristálticas, pues regula la separación de las partículas fermentables de las indigestibles. Este *fusus coli* se toma como punto de división entre colon proximal y colon distal, y sólo se encuentra en lagomorfos (Davies y Davies, 2003; Snipes *et al.*, 1982; Carabaño *et al.*, 2010).

Tejido Linfoide Asociado al Tubo Gastrointestinal

El buen funcionamiento del tubo gastrointestinal debe asegurar la buena absorción de nutrientes, excluyendo a los microorganismos -patógenos o no-, al mismo tiempo que debe distinguir nutrientes y microorganismos no patógenos, de los patógenos, para ignorar a los primeros y eliminar a estos últimos, que es lo que se conoce como tolerancia. La estructura del epitelio intestinal, así como la organización y funcionamiento del sistema inmune digestivo permiten que lo anterior sea posible (Fortun-Lamothe y Boullier, 2007).

Dentro de las muchas barreras de protección en contra de microorganismos patógenos que existen a lo largo del tubo gastrointestinal del conejo, se puede resaltar la presencia de tejido linfoide asociado (como el apéndice cecal) y células especializadas (como las células caliciformes responsables de la secreción de mucina, o las células de Paneth, encargadas de la secreción de péptidos antimicrobianos), los cuales regulan las interacciones de este tubo con la microbiota presente en él, así como el desarrollo de mecanismos de tolerancia y protección en contra de microorganismos patógenos (Carabaño *et.al.*, 2010; Fortun-Lamothe y Boullier, 2007).

En la figura 4 se puede observar esquemáticamente la organización del epitelio intestinal y el tejido linfoide asociado. A lo largo de las criptas, en el epitelio, se puede encontrar a las células caliciformes y a las células de Paneth, mientras que el tejido linfoide asociado se puede encontrar como células difusas localizadas en la *lamina propria*, u organizadas como folículos linfoides; las placas de Peyer constituyen agregados de estos folículos linfoides y en el conejo se pueden encontrar de dos a diez de estas estructuras a lo largo del intestino (Fortun-Lamothe y Boullier, 2007).

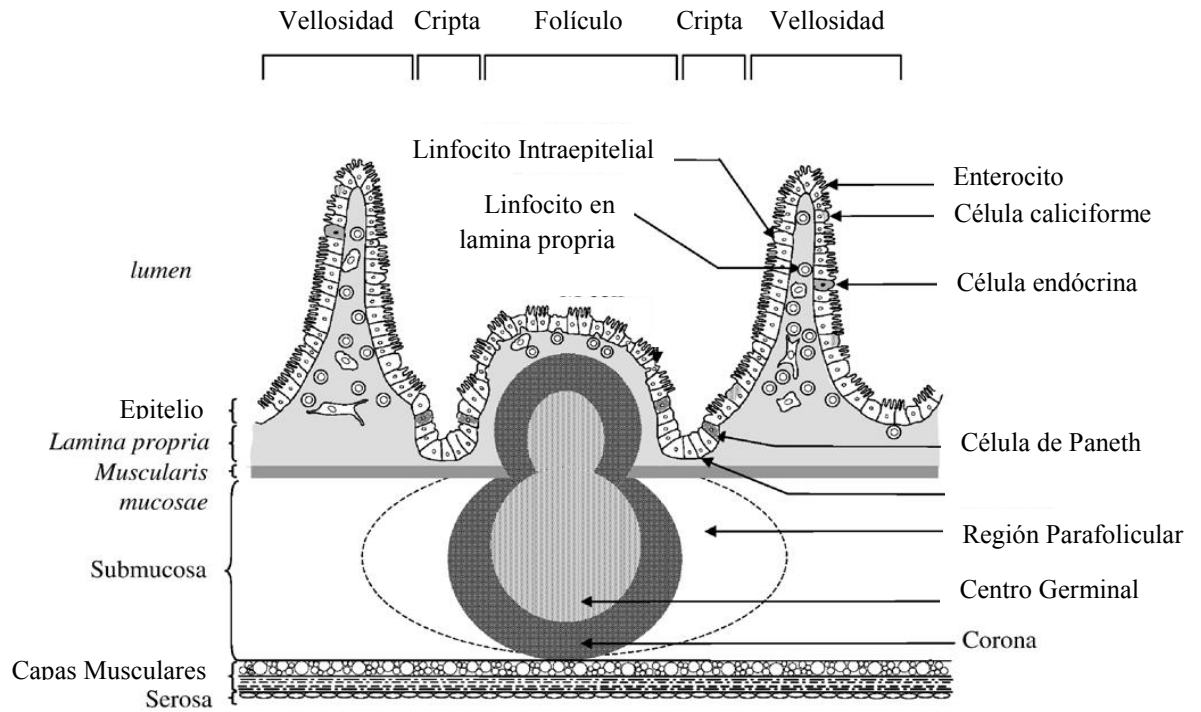


Figura 4. Organización del tejido linfoide digestivo
(Fortun-Lamothe y Boullier, 2007)

En la figura 5 se puede observar la localización del tejido linfoide asociado en el intestino delgado y grueso del conejo.

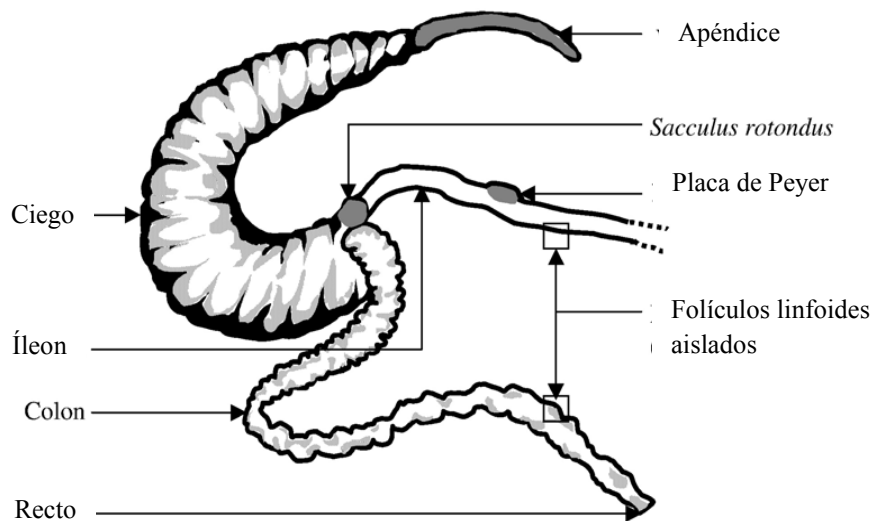


Figura 5. Localización de tejido linfoide asociado
(Fortun-Lamothe y Boullier, 2007)

1.4.1 Cecotrofia

Como se explicó con anterioridad, la presencia de la microbiota cecal por medio de la cecotrofia, permite al conejo obtener energía adicional, aminoácidos y vitaminas (Carabaño *et al.*, 2010; Gidenne *et al.*, 2010).

La cecotrofia consiste en la ingestión de cecotrofos o heces blandas tomadas directamente del ano, las cuales son deglutidas inmediatamente. Este comportamiento se encuentra influenciado por la luz, los patrones de ingestión y varía entre conejos mantenidos en cautiverio y los que se encuentran en vida libre. Se menciona que la cecotrofia se presenta aproximadamente cuatro horas después de la ingestión de alimento, y la cantidad de cecotrofos consumidos se encuentra directamente relacionado con la cantidad de fibra del alimento ingerido (Davies y Davies, 2003).

El *fusus coli* es el encargado de determinar la presencia de los cecotrofos en el colon, al detectar la concentración de AGV's, mandando una señal nerviosa que le indica al conejo que debe ingerir dichos cecotrofos.

El pH cecal tiende a decrecer durante el periodo de consumo de alimento, es decir, en las tardes y noches cuando ingresan grandes cantidades de sustrato al ciego (García *et al.*, 2002). Existe una influencia directa de las concentraciones de ácidos grasos volátiles y amoníaco (N-NH₃) cecal, sobre el pH cecal, ya que son las principales fuentes de H⁺ y OH⁻ respectivamente (García *et al.*, 2002).

1.4.2 Maduración del tubo gastrointestinal del conejo doméstico

Como se mencionó con anterioridad, en los gazapos existe cierta protección antimicrobiana a nivel estomacal conferida por el "aceite de la leche" o "aceite estomacal" (Carabaño *et al.*, 2010). Conforme aumenta la edad, su producción disminuye así como el pH gástrico; este último se constituye entonces como la barrera de protección contra la proliferación de microorganismos patógenos en el estómago e intestino delgado, por lo

que la protección del conejo en crecimiento frente a infecciones entéricas depende de la sincronización de la transferencia de ambos mecanismos (Davies y Davies, 2003).

De acuerdo a Carabaño *et al.* (2010), para que el conejo alcance la totalidad de su capacidad funcional, el tubo gastrointestinal debe pasar un periodo de adaptación de una dieta basada en leche, a la dependencia de alimento sólido. Esta adaptación no sólo afecta los procesos de digestión, sino también a la colonización microbiana y el desarrollo de los mecanismos de barrera en contra de microorganismos patógenos.

1.5 Desórdenes Digestivos

Los desórdenes digestivos normalmente se encuentran en la etapa de crecimiento y no en los adultos (Fortun-Lamothe y Gidenne, 2006), y de hecho, las enfermedades entéricas frecuentemente se presentan en gazapos alrededor de la etapa de destete, lo que ha llevado a un amplio uso de antibióticos en la cría de conejo; el mantenimiento de la salud del tubo gastrointestinal es complejo y recae en un delicado balance entre la mucosa, la microbiota presente, y los factores externos como pudiera ser la dieta (Fortun-Lamothe y Boullier, 2007).

Sin embargo, existen diversas estrategias para estimular el tejido linfoide digestivo, o favorecer a la microbiota benéfica para excluir a la patógena: por un lado, varios nutrientes incluyendo los ácidos grasos y fibras, se encuentran involucrados directamente en el desarrollo de la respuesta inmune; por otro lado, también se ha reportado el uso de flora exógena para estimular el tejido linfoide asociado al tubo gastrointestinal, y evitar así el desarrollo de patógenos entéricos (Fortun-Lamothe y Boullier, 2007).

1.6 Canulación en el conejo doméstico

Michelland y colaboradores (2011), encontraron que posterior a un cambio en la dieta, se observa un efecto en la concentración y diversidad de géneros bacterianos cecales en los siguientes dos días, regresando a su equilibrio en la siguiente semana; esta conclusión se obtuvo tras el sacrificio de 120 conejos a diferentes edades.

Para conocer de forma más precisa el proceso de digestión en animales herbívoros, se han desarrollado técnicas de canulación a diferentes niveles del aparato digestivo, las cuales facilitan el acceso al órgano involucrado por un periodo de tiempo prolongado, permitiendo la extracción de muestras y obtención de diferentes mediciones a lo largo del tiempo, además de disminuir la cantidad de individuos necesarios para la realización de este tipo de estudios (Cabrera, *et al.*, 2000). Sin embargo para el caso del conejo doméstico, los trabajos sobre canulación en la especie son escasos (Parker y McMillan, 1976; Carman y Waynforth, 1984; Marty y Vernay, 1984; Gidenne *et al.*, 1994; Blas *et al.*, 2003; Anaya, 2013).

Blas en 2003, encontró que tras canular a nivel del ileon, la recuperación de los conejos a la cirugía es rápida y satisfactoria. También se han realizado estudios a nivel del ciego con el fin de medir la actividad microbiana a través de la cuantificación de los ácidos grasos volátiles, aunque en la mayoría de los estudios realizados se ha utilizado material tomado de animales recién sacrificados (Gutiérrez, 2008; Michelland *et al.*, 2011), extrapolando los resultados a la situación *in vivo* (Conde, 2010). La técnica, consiste en la remoción de la parte terminal del intestino de animales anestesiados o recientemente sacrificados, con la posterior recolección manual de la digesta, sin embargo, se presentan varias desventajas, ya que solo proporciona una observación por animal, por lo que los animales no pueden ser usados como sus propios testigos (Parra, 2009; Cervantes, 2000).

De ahí la importancia del desarrollo y perfeccionamiento de técnicas de canulación a nivel cecal, como medio para conocer la actividad fermentativa *in vivo* y los cambios que se pueden presentar en ésta bajo diferentes condiciones, pues permite realizar estudios

directos sobre la microflora presente en el ciego y los productos de su metabolismo (Conde, 2010). Además, puede ser evaluada la permanencia de la digesta en el ciego, así como los cambios de pH producidos por los diferentes componentes de la dieta (Bellier y Gidenne, 1996; Bellier *et al.*, 1995).

Para el caso del conejo doméstico, la técnica quirúrgica *in vivo* permite la toma de varias muestras de un mismo animal a diferentes tiempos, además de que los animales se pueden usar en diferentes experimentos, reduciendo así el número de animales para este tipo de estudios (Bellier y Gidenne, 1996; Bellier *et al.*, 1995; Dihigo, 2012). Aunado a lo anterior, el volumen de contenido intestinal obtenido por el método de canulación es mayor que el del método de sacrificio, donde además ocurren procesos fermentativos *post-mortem*, afectando los valores reales *in vivo*, situación que no se presenta con la técnica de canulación. En el método de sacrificio, se observa un ligero aumento en el proceso de descamación de las células epiteliales que no tiene lugar cuando se emplean técnicas quirúrgicas (Dihigo, 1997).

Las aplicaciones que proporciona la canulación en la investigación de la nutrición de los conejos es muy amplia: puede evaluarse el efecto de factores como la dieta, edad y condición animal sobre la digestibilidad de aminoácidos y otros nutrientes, puede permitir el seguimiento de productos enzimáticos e inóculos en el tubo digestivo y evaluarse su desempeño de una forma directa (Bellier *et al.*, 1995).

1.7 El uso de probióticos en la alimentación animal

Una meta importante en la producción animal es la obtención de alimentos seguros para el consumo humano, sin dejar de lado el bienestar de los animales y minimizar el impacto al ambiente. Con miras a aumentar dicha producción, se han utilizado antibióticos a dosis sub-terapéuticas en la alimentación animal como promotores del crecimiento. Sin embargo, en varios países se prohibió su uso debido al desarrollo de resistencias, creando la necesidad de buscar alternativas que pudieran mejorar los

mecanismos naturales de defensa y reducir así, el uso de antibióticos para garantizar el rendimiento animal (Gaggia *et al.*, 2010; Dibner y Richards, 2005; Falcão-e-Cunha *et al.*, 2007; Verstegen y Williams, 2002).

Los probióticos son una de las alternativas, resultado de dicha búsqueda, y su beneficio consiste en disminuir la colonización de microorganismos patógenos en el intestino de los animales domésticos, y por consiguiente el uso de antibióticos profilácticos como aditivos (Wenk C., 2003; Leary, 2007). Estos aditivos alimenticios están compuestos de microorganismos vivos no patógenos (bacterias principalmente, o levaduras) administrados deliberadamente, y que al ser ingeridos en cantidades adecuadas, tienen un efecto positivo en el hospedero. Los microorganismos que se utilizan como aditivos en la alimentación animal en la Unión Europea son principalmente cepas de bacterias Gram positivas pertenecientes a los géneros *Bacillus* (*B. cereus* var. *toyoi*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*), *Enterococcus* (*E. faecium*), *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*), *Pediococcus* (*P. acidilactici*), *Streptococcus* (*S. infantarius*), y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* están presentes en grandes cantidades en el tubo gastrointestinal de los animales, a diferencia del género *Bacillus* y las levaduras, que no son componentes comunes (Anadón, 2006; Vasiljevic y Shah, 2008; Marteau, 2003; Bush *et al.*, 2004).

1.7.1 Efectos benéficos de los probióticos en intestino

El mantenimiento de la salud del tubo gastrointestinal es complejo y descansa en el delicado balance entre la mucosa y la microbiota comensal. El intestino provee condiciones ideales para albergar microorganismos, ofreciendo temperatura constante, pH regulado, suministro de nutrientes y remoción de metabolitos; a cambio, cuando existe un equilibrio dinámico con la microbiota (eubiosis), ésta apoya a los enterocitos en la protección de la mucosa intestinal contra microorganismos invasores, contribuye a la

maduración y estimulación del sistema inmune (estimulando la secreción de IgA), ayuda a la digestión de nutrientes y sintetiza vitaminas que son utilizadas por el hospedero. Sin embargo, esta microbiota se puede ver afectada tanto por el tipo de dieta como por factores intrínsecos del tubo gastrointestinal (secreciones, peristaltismo); esta alteración puede favorecer el crecimiento de poblaciones microbianas patógenas, denominándose como disbiosis (Bush *et al.*, 2004; Holzapfel y Schillinger, 2002).

Los probióticos ejercen su efecto reestableciendo la eubiosis por medio de diferentes vías, sin embargo los mecanismos de acción no han sido satisfactoriamente explicados; de acuerdo a diversos autores (Anadón, 2006; Bush *et al.*, 2004; Tejero-Sariñena, 2012), tienen los siguientes efectos:

- ✓ Estimulan la inmunidad local del intestino, aumentando la actividad de los anticuerpos
- ✓ Compiten por nutrientes con los microorganismos patógenos
- ✓ Exclusión competitiva, ya que los probióticos bloquean los receptores intestinales, evitando así que los patógenos se adhieran a la mucosa
- ✓ Producción de sustancias inhibitorias (como ácidos orgánicos), que proporcionan ventajas para el crecimiento de la microbiota deseable pero no de los patógenos
- ✓ Supresión de la producción de toxinas
- ✓ Influencia en las condiciones fisicoquímicas del intestino, como son el pH y el potencial de óxido-reducción, limitando así las condiciones de crecimiento de los microorganismos patógenos
- ✓ Influencia sobre el metabolismo de los ácidos biliares promoviendo la absorción de lípidos
- ✓ Mejoran la capacidad de absorción del hospedero

De acuerdo a Bush *et al.*, 2004, en general los probióticos pueden clasificarse en tres grupos principales: bacterias ácido-lácticas, levaduras y esporas de *Bacillus*; estos grupos difieren en sus propiedades y por ende, en sus mecanismos de acción.

1.7.2 Uso de probióticos en la alimentación del conejo doméstico

Como se describió con anterioridad, el mantenimiento de la salud del tubo gastrointestinal del conejo es complejo, y depende de la conservación del delicado balance entre la mucosa y la microbiota comensal, el cual es conservado gracias a los órganos linfoides como el apéndice cecal, *sacculus rotundus*, etc. (Fortun-Lamothe y Boullier, 2007).

1.8 El género *Bacillus* como probiótico

Las especies del género *Bacillus* han sido utilizadas como probióticos desde 1958, sin embargo éstas comenzaron a ser estudiadas a partir de 1994 (principalmente *Bacillus subtilis*) debido a la capacidad que tienen de esporular y así sobrevivir a condiciones ambientales extremas, haciéndolas termoestables y resistentes al pH ácido del estómago; de ahí que se prefiera este género, ya que puede almacenarse indefinidamente sin refrigeración además de que se asegura que la dosis ingerida, íntegra, alcance el intestino (Bush *et al.*, 2004; Cutting, 2011; Mazza, 1994; Hong *et al.*, 2009; Sanders y Morelli, 2003). La espora germina en el tubo digestivo pero no lo coloniza, y al ser un microorganismo externo, estimula el sistema inmune intestinal (Bush *et al.*, 2004; Cutting, 2011).

En general, los microorganismos aprobados para la nutrición animal como probióticos no constituyen una amenaza para la salud pública ya que no se absorben, manteniéndose en el tubo gastrointestinal (Bush *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICACIÓN

En la producción cunícola, el destete representa una de las etapas más críticas ya que el estrés, asociado a la inmadurez de las barreras físicas del tubo gastrointestinal contra patógenos, ocasiona que la mortalidad debida a diarreas en esta etapa pueda llegar hasta un 50%, lo que representa grandes pérdidas económicas para el productor (Davies y Davies, 2003; Rodríguez De Lara *et.al.* 2008; Cheeke *et al.*, 1989; Gutiérrez *et al.*, 2008)

De ahí que en los conejos, los cultivos microbianos han sido utilizados con el fin de reducir la incidencia y muerte por diarreas, y así, incrementar la eficiencia productiva. Los estudios realizados han sido dirigidos hacia el control del pH intestinal, utilizándose bacterias que son ajenas a la microbiota del conejo (Cheeke *et al.*, 1989).

Es por eso que se requiere el estudio directo de la actividad fermentativa cecal, valiéndonos de técnicas de canulación que nos permitan evaluar *in vivo* el efecto del uso de inóculos sobre la microbiota presente y los metabolitos producidos por ésta, observando también el efecto sobre los parámetros productivos.

3. HIPÓTESIS

La inclusión de *Bacillus subtilis* como probiótico en la alimentación de conejos canulados a nivel de la 13^{ava} asa cecal, en etapa de crecimiento, aumentará la concentración de bacterias totales y/o celulolíticas, mejorando la producción de ácidos grasos volátiles y el comportamiento productivo de estos individuos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la administración de un comprimido con *Bacillus subtilis* como probiótico en la alimentación del conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) en etapa de crecimiento, sobre algunas variables del contenido cecal y cecotrofos, y sobre parámetros productivos.

4.2 Objetivos Específicos

1. Desarrollar una cánula que permanezca más de 16 días fija a nivel de la 13^{ava} asa cecal.
2. Determinar la concentración molar de ácidos grasos volátiles a nivel de contenido cecal y en cecotrofos.
3. Calcular la cantidad de bacterias totales por gramo de contenido cecal y cecotrofos.
4. Establecer la cantidad de bacterias celulolíticas por gramo de contenido cecal y cecotrofos.
5. Calcular el consumo diario de alimento.
6. Evaluar la ganancia diaria de peso.
7. Establecer la conversión alimenticia.
8. Medir el rendimiento en canal.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Características de la cánula desarrollada

Debido a la inexistencia de cánulas para conejo doméstico a nivel comercial en México, y en base a los datos obtenidos por los trabajos de Anaya (2013) y Conde (2010), se diseñó una cánula que permitiera obtener muestras de contenido cecal por un periodo prolongado.

El material utilizado fue un tubo de manguera de policloruro de vinilo –PVC-, otorgándole cierta flexibilidad necesaria para su manipulación durante la colocación quirúrgica, sin perder la firmeza precisa para mantenerse en su posición y permitir la toma de muestras. Las dimensiones de la cánula utilizada fueron 1.2 cm de largo por 0.7 cm de diámetro, y los extremos más anchos, 1.5 cm de diámetro, utilizando un tapón de etilvinilacetato –fomi- (Figura 6).

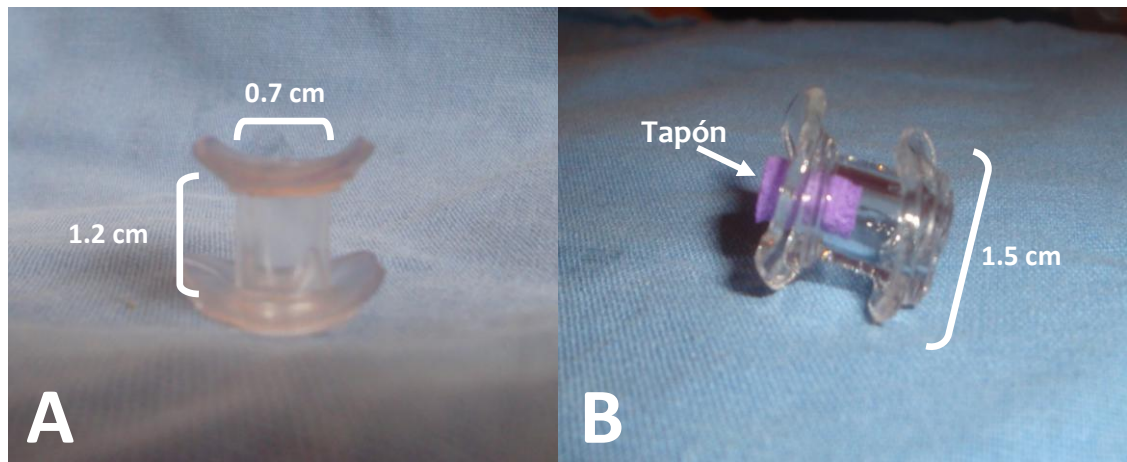


Figura 6. Dimensiones de la cánula de policloruro de vinilo con tapón de etilvinilacetato.
A. Vista Lateral B. Cánula con tapón

5.2 Unidades experimentales

Se utilizaron 20 hembras de conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Nueva Zelanda. El criterio de inclusión aplicado fue la utilización de ejemplares clínicamente sanos de 21 días de edad; el peso promedio fue de 555.75 gramos (g).

Las conejas se mantuvieron en jaulas tipo batería, alojándose un animal por jaula; cada jaula contaba con un comedero tipo tolva de lámina galvanizada donde diariamente se ofreció alimento comercial peletizado para conejo[§] *ad libitum*. Se proveía de agua limpia y fresca por medio de una línea de bebederos con chupones automáticos.

Todas las conejas se canularon en el flanco izquierdo, a nivel de la 13^{ava} asa cecal.

Los manejos descritos en el presente trabajo, cumplieron con las directrices estipuladas por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

5.2.1 Periodo de Adaptación

Una vez en las instalaciones, se sometió a las conejas a un periodo de adaptación de una semana en el que se constató el consumo de alimento sólido.

5.3 Procedimiento Quirúrgico

Terminada la semana de adaptación, es decir a los 28 días de edad, las conejas se sometieron al procedimiento quirúrgico para la colocación de la cánula. Dichos procedimientos se realizaron en los quirófanos de la Unidad de Investigación Quirúrgica del Hospital Juárez de México, con las condiciones de asepsia y esterilización requeridos para este tipo de procedimientos.

[§] Purina Agribusiness CONEJINA N. Análisis garantizado: Humedad 12% Máx, Proteína cruda 15.5% Mín, Grasa cruda 2% Mín, Calcio 1% Mín, y Fósforo 0.55% Mín.

El manejo prequirúrgico consistió en rasurar la región ventral del abdomen y el flanco izquierdo de todas las conejas, además de mantenerlas en ayuno por 24 horas.

Se utilizó Xilacina como tranquilizante a dosis de 5mg/kg de peso por vía intramuscular (IM), y posteriormente Ketamina como anestésico a dosis de 30mg/kg de peso IM.

Una vez alcanzada la inconsciencia, las conejas eran colocadas en posición decúbito dorsal para ser infiltradas por línea media a nivel subcutáneo con Xilocaína, minutos después se realizaba una incisión en piel de aproximadamente 5 cm de largo, para posteriormente abordar los siguientes planos mediante disección roma con pinzas hasta exponer la línea alba, ésta se cortaba para llegar a cavidad, localizar el ciego, exteriorizarlo y ubicar la 13^{ava} asa cecal.

Posteriormente se procedía a infiltrar subcutáneamente con Xilocaína el flanco izquierdo, para minutos después incidir piel en el punto central de la base de un triángulo imaginario formado por el extremo ventral del 13^{vo} arco costal, el extremo del proceso transversal de la 5^{ta} vértebra lumbar y la articulación coxofemoral. La incisión lateral tenía una longitud de 1.5 cm aproximadamente, y después de incidir los planos musculares (oblicuo abdominal externo e interno), fascia transversa y peritoneo, se traccionaba la 13^{ava} asa cecal hacia la incisión lateral para exponer una pequeña porción, fijarla con un punto simple a la pared e incidir hasta llegar a mucosa.

Una vez incidido el ciego, se introducía la cánula sin tapón y se fijaba al órgano, músculo y piel por medio de un surgete continuo que traspasaba cada plano y cánula empleando suturas de ácido poliglicólico de 5-0. Posteriormente se verificaba que no hubiera fugas de contenido cecal alrededor de la cánula y que efectivamente había paso de contenido cecal a través de ésta para después colocar su tapón. Constatado lo anterior, se procedía a cerrar las dos incisiones mediante puntos de candado con suturas de ácido poliglicólico 3-0 en los planos inferiores, para cerrar con sutura de nylon de 3-0 a nivel de piel, mediante puntos de candado.

Para la terapia post-operatoria se utilizó Enrofloxacin a dosis de 10mg/kg de peso por 3 días y Flunixin de Meglumina a dosis de 0.4 mg/kg de peso por 5 días, ambos por vía IM.

5.4 Tratamientos

Se evaluaron cuatro tratamientos con cinco repeticiones cada uno; los animales se distribuyeron aleatoriamente a cada tratamiento:

- ✓ Tratamiento 1: Administración de *B. subtilis* como probiótico, sin collarín isabelino
- ✓ Tratamiento 2: Administración de *B. subtilis* como probiótico, con collarín isabelino
- ✓ Tratamiento 3: Sin administración de probiótico, sin collarín isabelino
- ✓ Tratamiento 4: Sin administración de probiótico, con collarín isabelino

Como probiótico, se utilizaron comprimidos de la marca CALSPORIN®, de Calpis. Cada gramo contiene 6×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC).

La administración del probiótico para los tratamientos 1 y 2 inició después de la primer toma de muestras; se administró la dosis recomendada por el fabricante: 2 comprimidos por coneja por día (24×10^8 UFC/coneja/día). Para garantizar la ingesta de la dosis especificada, se procedió a macerar y diluir dos comprimidos en 5 ml de agua purificada, la solución resultante se tomó con una jeringa para después administrarla por vía oral, una vez al día, por coneja. A los animales de los tratamientos 3 y 4 se les proporcionó la misma cantidad de agua purificada al día, sin el probiótico (placebo).

Se utilizaron collarines isabelinos en los tratamientos 2 y 4, con el objetivo de evitar la ingestión de los cecotrofos y poder obtener la muestra de éstos. Cabe destacar que los collarines se colocaron inversamente al uso convencional, ya que se observó que de esta forma las conejas tenían más libertad para moverse, comer, beber, e incluso descansar, disminuyendo así el estrés que este manejo implicaba, y su posible efecto sobre las variables a medir. En la figura 7 se puede apreciar la colocación de los collarines isabelinos.

5.5 Muestreos

Ocho días después de la cirugía, se procedió al primer muestreo para establecer los valores basales de las variables a evaluar, mediante la obtención de muestras de contenido cecal y cecotrofos.

La obtención de contenido cecal se llevó a cabo mediante colecta directa a través de la cánula, en tubos Eppendorf de 2 ml con tapa de rosca previamente esterilizados, aprovechando la motilidad del ciego (Figura 8). Inmediatamente después de tomada la muestra, se colocaba el tapón en la cánula.

Para la obtención de las muestras de cecotrofos de los tratamientos 2 y 4, los collarines isabelinos sólo se colocaban el día del muestreo a las 7 a.m. y se retiraban una vez terminado el muestreo. Las muestras de cecotrofos se recolectaron manualmente, y se depositaron en bolsas de polietileno (Figura 9).

Las muestras obtenidas debidamente identificadas, se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4°C durante su almacenamiento y posterior transporte para su análisis.

El procedimiento se repitió a los 15 y a los 30 días después del muestreo inicial.

Una vez concluido el primer muestreo, se procedió a administrar el probiótico.

Aunado al manejo quincenal antes descrito, se realizaron manejos semanales durante el periodo experimental, donde todas las unidades experimentales se pesaron semanalmente con el fin de estimar la ganancia diaria de peso (GDP); asimismo se llevaron a cabo pesajes del alimento no consumido semanalmente, para establecer el consumo de alimento mediante la diferencia del valor antes mencionado y la cantidad de alimento ofrecido.

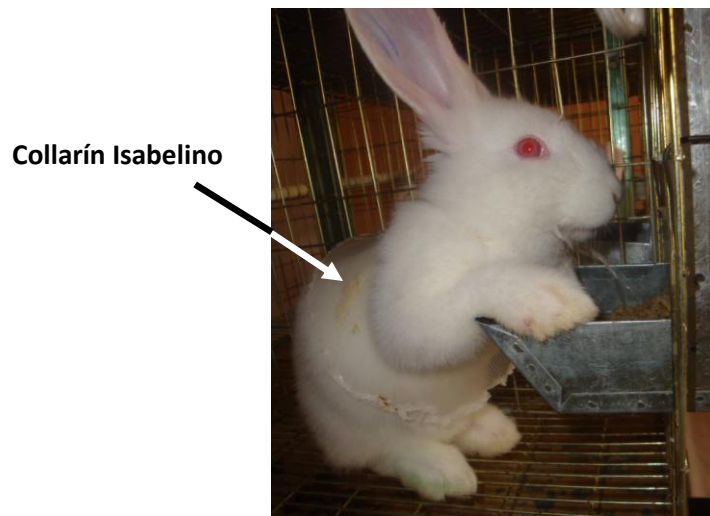


Figura 7. Coneja con collarín isabelino

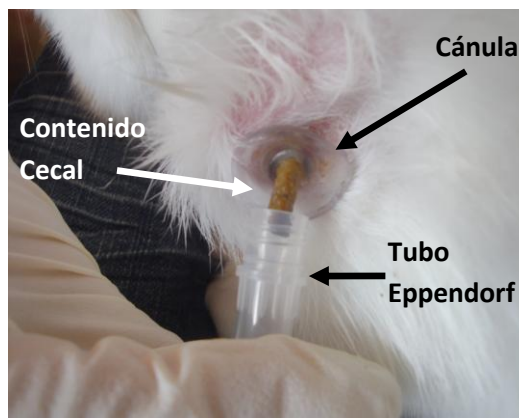


Figura 8. Obtención de muestra de contenido cecal



Figura 9. Obtención de muestra de Cecotrofos
A. Cecotrofos en charola B. Almacenaje de muestra de cecotrofos

5.6 Procesamiento de Muestras

Las muestras se trabajaron en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Todo el material fue esterilizado antes de su uso en una esterilizadora de la marca TUTTNAUER Modelo 2540E.

Se realizó una dilución inicial de cada una de las muestras obtenidas (contenido cecal y cecotrofos), pesándose 0.5g de éstas en una balanza OHAUS modelo Explorer E1B120; dicha cantidad se depositó en un tubo de ensaye, al que luego se le agregaron 5 ml de agua destilada. Posteriormente se procedió a homogenizar dicha dilución mediante el uso de un vortex de la marca THERMOLYNE Modelo 37615 hasta la suspensión total de los sólidos.

A partir de esta dilución inicial, se obtuvieron las submuestras necesarias para cada una de las diferentes determinaciones, como a continuación se describe

5.6.1 Determinación de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)

Para esta determinación, se modificó la técnica descrita por Portela (2012).

En viales para centrifuga previamente esterilizados, se colocaron 1.2 ml de la dilución inicial y se agregaron 0.3 ml de ácido metafosfórico al 25% para mantener una proporción 4:1 de muestra:ácido respectivamente; posteriormente los viales se centrifugaron a 13, 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos en una centrífuga de la marca HETTICH ZENTRIFUGEN Modelo EBA 21.

El sobrenadante resultante se colocó en viales para cromatógrafo para determinar los ácidos grasos volátiles, mediante Cromatografía de Gases utilizando un cromatógrafo PERKIN ELMER modelo Clarus 500 con automuestreador, detector de ionización de flama y columna capilar Elite FFAP (PERKIN ELMER); se empleó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 23.3 ml por minuto y aire de hidrógeno para combustión de la flama; el

volumen de inyección fue de 1 µl. Las temperaturas del horno, el detector de ionización de flama (FID) e inyector fueron 120°, 250° y 250° respectivamente.

Los estándares utilizados fueron: ácido butírico de Merck (S33347 119); ácido propiónico de Sigma-Aldrich (P1386) y ácido acético de J.T.Baker (0018-02). Los tiempos de retención para los analitos a determinar fueron: acetato al minuto 1.27, propionato al minuto 1.61 y butirato al minuto 2.11.

5.6.2 Determinación de Bacterias Totales (BT)

La estimación de la concentración de bacterias totales se realizó como lo reporta Portela (2012) con algunas modificaciones.

En un tubo de ensaye de vidrio de 13x100 mm, previamente esterilizado, se colocaron 0.3ml de formaldehído y se agregaron 1.2ml de la dilución inicial con el fin de fijar las bacterias presentes.

Se utilizó la técnica de conteo directo en una cámara Petroff-Hausser (HALISSER SCIENTIFIC®) con un microscopio OLYMPUS Modelo BX51TRF a una magnificación de 1000X.

Para estimar la concentración de bacterias totales, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{BACTERIAS TOTALES/ml}^{-1} = (X) (FD_1) (FD_2) (2 \times 10^7)$$

Donde:

X = media de los conteos de bacterias en los cuadros de la cámara de Petroff-Hausser

FD₁ = valor inverso de la dilución inicial

FD₂ = valor inverso de la dilución en formaldehído

2x10⁷ = factor de dilución de la cámara

5.6.3 Determinación de Bacterias Celulolíticas (BC)

Referente a la estimación de la concentración de bacterias celulolíticas, se utilizó la técnica del número más probable de acuerdo a la metodología descrita por Cobos (2011), utilizando 0.5ml de la dilución inicial para inocularse en los tubos de cultivo.

5.7 Parámetros Productivos

5.7.1 Consumo de Alimento

Diariamente se pesó la cantidad de alimento ofrecido por coneja. Al término de una semana, se pesaba la cantidad de alimento no consumido por individuo y ese valor se restaba a la cantidad total de alimento ofertado, con lo que se obtenían los gramos de alimento consumidos en la semana; éste último valor se dividió entre los siete días de la semana, para estimar el consumo diario de alimento.

5.7.2 Ganancia de Peso

Las conejas se pesaron semanalmente; el valor semanal se dividió entre los siete días de la semana para estimar la ganancia diaria de peso por individuo.

5.7.3 Conversión Alimenticia

Este parámetro se determinó aritméticamente, en base a la proporción de alimento consumido y gramos de peso ganados semanalmente.

5.7.4 Rendimiento en Canal

Al día 77 de edad, se midió el peso vivo de cada coneja antes del sacrificio, el cual se ejecutó mediante desnucamiento y posterior desangrado por corte de yugular, de acuerdo a lo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995.

La canal se obtuvo retirando la cabeza a la altura del atlas, la piel, los miembros torácicos a la altura del carpo, los miembros pélvicos a la altura del tarso, y se evisceró totalmente para pesarse inmediatamente y calcular así, el rendimiento de la canal.

5.8 Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos, se utilizó el programa estadístico JMP®7, 2007 de SAS INSTITUTE INC.

5.8.1. Determinaciones en contenido cecal

Para la determinación de la concentración molar de ácidos grasos volátiles, la cantidad de bacterias totales y la de bacterias celulolíticas por gramo de contenido cecal, se estableció un diseño factorial 2x2, tomando como primer factor el suministro de probiótico (con o sin probiótico), mientras que el segundo factor fue el uso de collarín isabelino (con o sin collarín), para tres observaciones repetidas en el tiempo. El modelo utilizado fue:

$$Y = XB + E$$

Donde:

Y: Matriz de 20 x 3 cuyos renglones son los valores de las variables respuesta del tiempo 1 al 3 en contenido cecal, de cada una de las 20 conejas.

X: Matriz diseño de 20 x 9.

B: Matriz de parámetros de 9 x 6. Cada columna es un vector $\beta^{(t)}$ de parámetros al tiempo t. t = 1, 2, 3.

$$\beta^{(t)T} = (\mu^{(t)} + P_1^{(t)} + P_2^{(t)} + C_1^{(t)} + C_2^{(t)} + PC_{11}^{(t)} + PC_{21}^{(t)} + PC_{12}^{(t)} + PC_{22}^{(t)})$$

donde:

$\mu^{(t)}$: media general al tiempo t

$P_i^{(t)}$: efecto del nivel i-ésimo del probiótico al tiempo t. i=1,2

$C_j^{(t)}$: efecto del nivel j-ésimo del collarín al tiempo t. j=1,2

$PC_{ij}^{(t)}$: efecto de la interacción del nivel i del probiótico con el nivel j de collarín al tiempo t. i=1,2 j=1,2

E: Matriz de errores aleatorios de 20 x 3

5.8.2 Determinaciones en cecotrofos

Para la determinación de la concentración molar de ácidos grasos volátiles, la cantidad de bacterias totales y la de bacterias celulolíticas por gramo de cecotrofo, se estableció un modelo multivariado de un solo factor con dos niveles para tres observaciones repetidas en el tiempo, el modelo utilizado fue:

$$Y = XB + E$$

Donde:

Y: Matriz de 10 x 3 cuyos renglones son los valores de las variables respuesta estudiadas en cecotrofos del tiempo 1 al 3, de cada uno de los 10 conejos en el experimento.

X: Matriz diseño de 10 x 3.

B: Matriz de parámetros de 3 x 3. Cada columna es un vector $\beta^{(t)}$ de parámetros al tiempo t. t= 1, 2, 3.

$$\beta^{(t)T} = (\mu^{(t)} + P_1^{(t)} + P_2^{(t)})$$

donde:

$\mu^{(t)}$: media general al tiempo t

$P_i^{(t)}$: efecto del nivel i-ésimo del probiótico al tiempo t. i=1,2

E: Matriz de errores aleatorios de 10 x 3

5.8.3 Parámetros Productivos

5.8.3.1 Ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia

Para estas variables productivas se utilizó un análisis de varianza multivariado de un factorial 2x2 para seis observaciones repetidas en el tiempo, con cinco repeticiones por tratamiento; el modelo es el siguiente:

$$Y = XB + E$$

Donde:

Y: Matriz de 20 x 6 cuyos renglones son los valores de las variables respuesta del tiempo 1 al 6, de cada uno de los 20 conejos en el experimento.

X: Matriz diseño de 20 x 10.

B: Matriz de parámetros de 10 x 6. Cada columna es un vector $\beta^{(t)}$ de parámetros al tiempo t. t= 1..6.

$$\beta^{(t)T} = (\mu^{(t)} + P_1^{(t)} + P_2^{(t)} + C_1^{(t)} + C_2^{(t)} + PC_{11}^{(t)} + PC_{21}^{(t)} + PC_{12}^{(t)} + PC_{22}^{(t)}) + d$$

donde:

$\mu^{(t)}$: media general al tiempo t

$P_i^{(t)}$: efecto del nivel i-ésimo del probiótico al tiempo t. i=1,2

$C_j^{(t)}$: efecto del nivel j-ésimo del collarín al tiempo t. j=1,2

$PC_{ij}^{(t)}$: efecto de la interacción del nivel i del probiótico con el nivel j de collarín al tiempo t. i=1,2 j=1,2

d: efecto del valor basal de la variable respuesta de la coneja k (probiótico i, collarín j)

E: Matriz de errores aleatorios de 20 x 6

5.8.3.2 Rendimiento en canal

Para este parámetro se utilizó un modelo univariado para un diseño factorial 2x2, con cinco replicaciones por tratamiento:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + C_j + PC_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk}: rendimiento en canal del conejo k que tiene el nivel j de collarín y el nivel i de probiótico. k=1,..,5 j=1,2 i=1,2

P_i: efecto del nivel i de probiótico. i=1,2

C_j: efecto del nivel j de collarín. J=1,2

PC_{ij}: efecto de la interacción del nivel i de probiótico con el nivel j de collarín

ε_{ijk}: error aleatorio del conejo k que tiene el nivel j de collarín y el nivel i de probiótico

En los casos donde se encontraron diferencias significativas a lo largo del tiempo, se hicieron comparaciones entre tiempos sucesivos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CÁNULAS

Las cánulas desarrolladas en el presente estudio, tuvieron buena aceptación al permanecer en sus respectivas fístulas por 49 días, momento en que se retiraron. En algunos individuos se presentó cierta irritación dérmica en la zona circundante a la cánula, sin embargo con la adecuada asepsia del área, el tejido cicatrizó adecuadamente, tal como se puede apreciar en la figura 10.

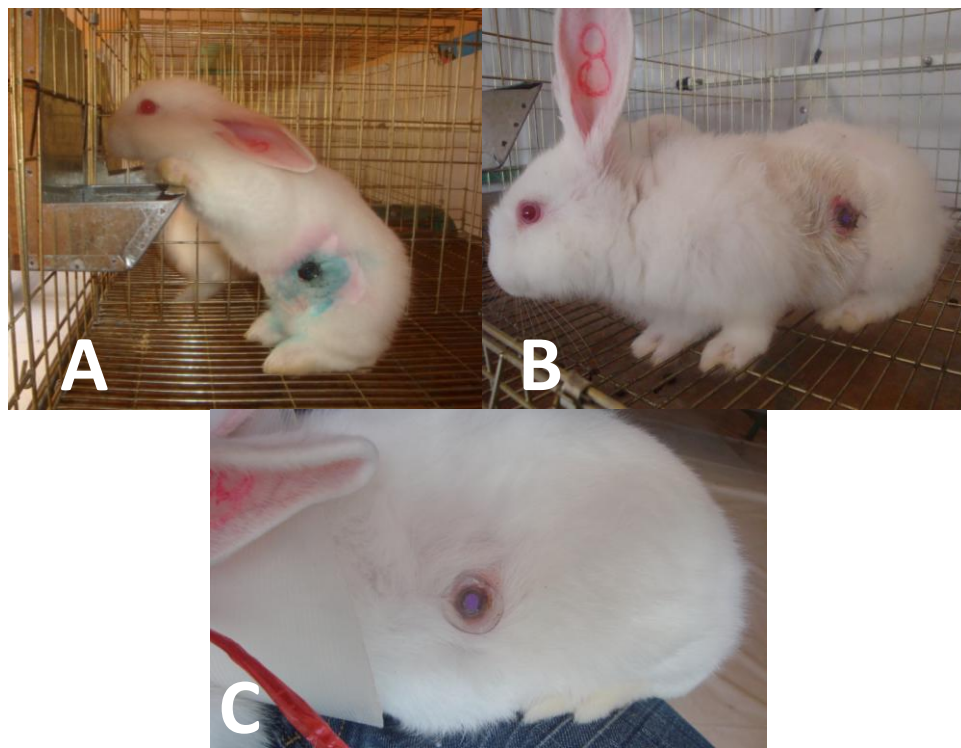


Figura 10. Cánulas *in situ*

A. A los 35 días de edad B. A los 49 días de edad C. A los 63 días de edad

El diseño de esta cánula fue similar al utilizado por Carman y Waynforth (1984); en dicho estudio la canulación no se desafió más allá de 35 días, sin embargo la fijación se llevó a cabo en el flanco derecho y la cánula utilizada involucraba un componente de acero inoxidable.

Con un diseño de cánula diferente, Anaya (2013) encontró una duración promedio de 16 días para cánulas de polietileno y de 12.6 días para cánulas de silicón, ambas fijadas en flanco izquierdo a nivel de la 13^{ava} asa cecal; Conde (2012) evaluó la canulación al mismo nivel por dos semanas.

La ventaja del material utilizado en el diseño de la cánula del presente estudio es que, por un lado, es lo suficientemente ligero para no causar mayor daño a las capas histológicas involucradas, lo que seguramente ayudó a que la cánula se mantuviera en el lugar de fijación; por otro lado, el material confiere cierta rigidez que evitó la estenosis consecuencia de la contracción de los músculos abdominales adyacentes, tal como reporta Anaya (2013).

Se cuidó que las dimensiones de la fístula y de la cánula fueran adecuadas para no afectar la motilidad del órgano como mencionan Parker y McMillan (1976); de hecho, es de resaltar que en el presente estudio no se presentó prolapso del órgano a través de la cánula como encontró Anaya (2013) en algunos casos.

Referente al volumen recolectado, Carman y Waynforth (1984) reportan por lo menos 2 g de contenido cecal por conejo por muestreo, mientras que Anaya (2013) obtuvo 2 ml por muestreo; con la técnica de canulación empleada en este estudio se obtuvo hasta 4 g de contenido cecal por muestreo (cada 15 días), cantidad necesaria para la realización de las determinaciones especificadas.

Con lo anterior, se puede observar que tanto el diseño de la cánula, así como la forma de fijación utilizadas en el presente estudio, facilitan en gran medida la toma de muestras de contenido cecal (véase figura 8) sin la necesidad de procedimientos más elaborados involucrados para la limpieza de los componentes o la extracción en sí de la muestra (Parker y McMillan, 1976; Carman y Waynforth, 1984).

La cánula desarrollada no sólo facilita la obtención de la muestra: el tiempo de permanencia en el sitio de fijación fue mayor que con otros diseños de cánulas, con lo que

se favorecen los estudios de evaluación de efectos de diferentes tratamientos sobre variables cecales, incluso, por todo el periodo de engorda.

6.2 ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES

6.2.1 Contenido Cecal

Las medias por mínimos cuadrados de los ácidos grasos volátiles en contenido cecal y sus errores estándar por tratamiento a lo largo del periodo de estudio, se pueden observar en el cuadro 4.

CUADRO 4. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES EN CONTENIDO CECAL DE CONEJOS CANULADOS POR TRATAMIENTO

		ACÉTICO		PROPIÓNICO		BUTÍRICO	
		<i>COLLARÍN</i>					
		Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin
		MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE
PROBIÓTICO	Con	93.12 ± 1.75	94.98 ± 1.75	3.88 ± 1.06	2.21 ± 1.06	3.00 ± 1.27	2.81 ± 1.27
	Sin	95.01 ± 1.75	95.56 ± 1.75	1.58 ± 1.06	0.93 ± 1.06	3.42 ± 1.27	3.51 ± 1.27

Valores expresados en mMol/100mMol
p>0.05

MMC = Medias por Mínimos Cuadrados
EE = Error Estándar

Para el caso de ácido acético en contenido cecal, no se encontró ningún efecto significativo ($p>0.05$) de la inclusión o no de *Bacillus subtilis* como probiótico, ni del uso o no de collarín isabelino. La única diferencia encontrada ($p<0.001$) fue en el contenido promedio de ácido acético entre la primera y segunda medición en el tiempo.

En cuanto al ácido propiónico en contenido cecal, no se encontró ningún efecto ($p>0.05$) de los factores estudiados ni de su interacción en el contenido promedio de ácido propiónico en materia cecal. Tampoco se encontraron diferencias ($p>0.05$) en el contenido promedio de ácido propiónico entre tiempos.

Finalmente para el ácido butírico cecal, tampoco se encontró efecto ($p>0.05$) de los factores estudiados ni de su interacción en el contenido promedio de ácido butírico en materia cecal. La única diferencia significativa encontrada ($p<0.001$), fue en el contenido promedio de ácido butírico entre la primera y segunda medición en el tiempo.

Las concentraciones promedio por tiempo por tratamiento de los ácidos grasos volátiles en contenido cecal y sus errores estándar, se pueden observar en el cuadro 5.

CUADRO 5. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES EN CONTENIDO CECAL DE CONEJOS CANULADOS POR TRATAMIENTO POR TIEMPO

		TIEMPO 1		TIEMPO 2		TIEMPO 3	
		COLLARÍN					
		Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin
		MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE
ÁCIDO ACÉTICO							
PROBIÓTICO	Con	97.12 ± 1.94	97.39 ± 1.94	91.90 ± 2.67	92.25 ± 2.67	90.33 ± 2.58	95.30 ± 2.58
	Sin	100.00 ± 1.94	100.00 ± 1.94	89.99 ± 2.67	91.44 ± 2.67	95.03 ± 2.58	95.24 ± 2.58
ÁCIDO PROPIÓNICO							
PROBIÓTICO	Con	2.88 ± 1.94	2.61 ± 1.94	3.55 ± 1.76	3.42 ± 1.76	5.21 ± 1.32	0.58 ± 1.32
	Sin	0.00 ± 1.94	0.00 ± 1.94	4.73 ± 1.76	2.78 ± 1.76	0.00 ± 1.32	0.00 ± 1.32
ÁCIDO BUTÍRICO							
PROBIÓTICO	Con	0.00	0.00	4.55 ± 2.58	4.33 ± 2.58	4.46 ± 2.20	4.11 ± 2.20
	Sin	0.00	0.00	5.28 ± 2.58	5.78 ± 2.58	4.97 ± 2.20	4.76 ± 2.20
Valores expresados en mMol/100mMol				MMC = Medias por Mínimos Cuadrados			
$p>0.05$				EE = Error Estándar			
$p<0.001$ para ácido acético y butírico entre tiempo 1 y 2							

6.2.2 Cecotrofos

Las medias por mínimos cuadrados de los ácidos grasos volátiles en cecotrofos y sus errores estándar por tratamiento obtenidos en el presente estudio, se presentan en el cuadro 6.

CUADRO 6. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES EN CECOTROFOS DE CONEJOS CANULADOS POR TRATAMIENTO

		ACÉTICO	PROPIÓNICO
		<i>Con COLLARÍN</i>	
		MMC ± EE	MMC ± EE
PROBIÓTICO	Con	98.12 ± 0.71	1.88 ± 1.06
	Sin	98.88 ± 0.71	0.92 ± 0.731.06

Valores expresados en mMol/100mMol *MMC = Medias por Mínimos Cuadrados*
p>0.05 *EE = Error Estándar*

Para el ácido acético determinado en cecotrofos, no se encontraron diferencias ($p>0.05$) en el contenido promedio entre el grupo que recibió probiótico y el que no lo recibió. La única diferencia encontrada ($p<0.01$) para este analito, fue en el contenido promedio entre el tiempo 1 y el tiempo 3.

De igual forma, no se encontraron diferencias ($p>0.05$) en el contenido promedio de ácido propiónico en cecotrofos entre el grupo que recibió probiótico y el que no lo recibió. La única diferencia encontrada ($p<0.01$) fue en el contenido promedio de ácido acético en cecotrofos entre el tiempo 1 y el tiempo 3.

En el caso del ácido butírico, sólo se obtuvo una lectura en los cecotrofos del grupo sin probiótico en el tercer muestreo.

Las concentraciones promedio obtenidas de ácido acético y propiónico en cecotrofos por tratamiento a través del tiempo, se pueden observar en el cuadro 7.

CUADRO 7. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES EN CECOTROFOS DE CONEJOS CANULADOS POR TRATAMIENTO POR TIEMPO

		TIEMPO 1	TIEMPO 2	TIEMPO 3
Con COLLARÍN				
		MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE
ÁCIDO ACÉTICO				
PROBIÓTICO	Con	100.00	98.33 ± 1.52	96.02 ± 1.00
	Sin	100.00	98.64 ± 1.52	98.01 ± 1.00
ÁCIDO PROPIÓNICO				
PROBIÓTICO	Con	0.00	1.67 ± 1.52	3.98 ± 1.02
	Sin	0.00	1.36 ± 1.52	1.41 ± 1.02
<p><i>Valores expresados en mMol/100mMol</i> <i>p>0.05</i> <i>p<0.01 para ácido acético y propiónico entre tiempo 1 y 3</i></p> <p style="text-align: right;"><i>MMC = Medias por Mínimos Cuadrados</i> <i>EE = Error Estándar</i></p>				

De acuerdo a Jehl *et al.* (1996), la actividad fermentativa microbiana es similar en contenido cecal que en cecotrofos, de ahí que los resultados en relación a AGV's en contenido cecal y en cecotrofos se expliquen como sigue.

Dado que la actividad fermentativa cecal inicia una vez que el gazapo comienza a consumir alimento sólido y éste ingresa al ciego, la producción de AGV's es más evidente conforme va creciendo el animal (Figura 11), pues la actividad fermentativa cecal se establece; por tanto, el patrón de fermentación cambia con la edad y es hasta los 25-30 días que se establece como tal el perfil de AGV's característico de los lagomorfos (ver cuadro 3) al invertirse la proporción propionato/butirato (Fortun-Lamothe y Gidenne, 2006; Padilha, *et al.*, 1995; Gidenne, *et al.*, 2002). Lo anterior explica los cambios encontrados en las concentraciones de los tres AGV's estudiados.

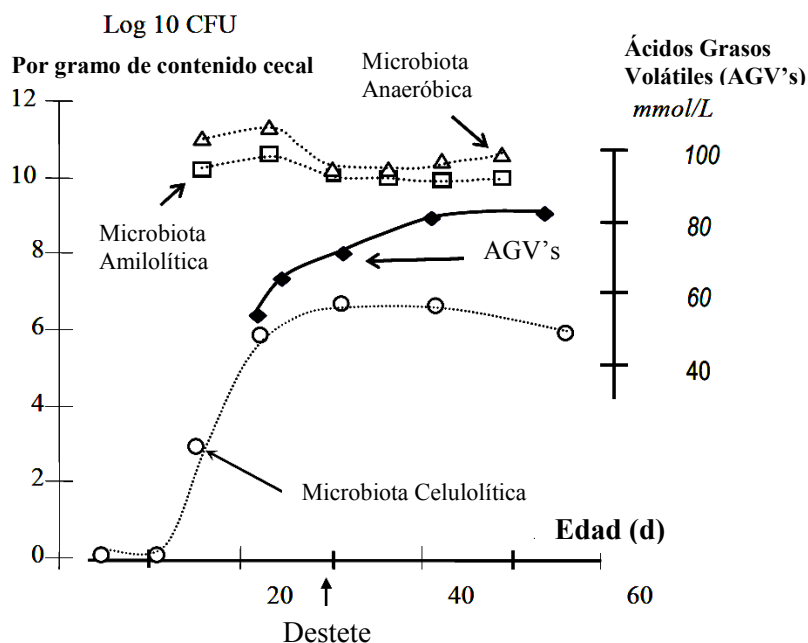


Figura 11. Relación entre el establecimiento de microbiota cecal y producción de ácidos grasos volátiles de conejos en crecimiento
(Carabaño *et al.*, 2006)

En el tiempo 1 (primer muestreo) a pesar de que las conejas ya tenían 35 días de edad, sólo se obtuvieron lecturas de ácido acético y ácido propiónico; esto seguramente se debió al efecto de la antibioterapia postoperatoria y tal vez por esa razón el perfil característico de AGV's aún no se observó. La naturaleza química del butirato también puede explicar parte de su nula lectura en este primer muestreo, ya que como mencionan Stevens y Hume (1998), a pesar de que los AGV's se encuentran en forma no disociada entre 1% y 6%, las membranas celulares tienden a ser permeables a la difusión pasiva de ácidos orgánicos liposolubles no disociados bajo gradiente de concentración, incrementándose dicha solubilidad con cada grupo CH₂ adicional que posea el ácido orgánico en cuestión. Esto también fue reportado por Marty y Vernay (1984), ya que encontraron que la absorción de los AGV's es más rápida entre más grande sea la molécula, siendo hasta 50% para el butirato, propionato 43% y acetato 30% después de 20 minutos de introducidos en el ciego; Stevens y Hume (1998) mencionan que la mayoría

del butirato absorbido es transformado a cuerpos cetónicos y CO₂, parte del acetato también es utilizado en la cetogénesis. Con lo anterior, pudiera establecerse que la poca producción de butirato haya sido rápidamente absorbida y no detectada en este muestreo en contenido cecal.

A nivel de cecotrofos, Stevens y Hume (1998) refieren que mientras los enterocitos del intestino delgado obtienen energía a través de glutamina y glucosa, los colonocitos utilizan como fuente de energía además de esas dos moléculas, a los AGV's, principalmente al butirato, luego al acetato y finalmente al propionato; debido a la aún baja concentración y a que por el número de CH₂ es más liposoluble que el acetato (Marty y Vernay, 1984) el ácido propiónico se absorbió en mayor medida a nivel de colon, reflejándose en su nula presencia (al igual que el ácido butírico) en cecotrofos.

A los 49 días de edad de las conejas (segundo muestreo), se observaron diferencias ($p < 0.001$) en contenido cecal de las concentraciones de ácido acético y butírico entre los tiempos 1 y 2, con lo que la proporciones de los tres ácidos grasos estudiados, correspondieron ya al perfil característico de AGV's del orden *Lagomorpha* (Cuadro 3 y 5) esto debido al establecimiento de la actividad fermentativa característica.

La concentración de AGV's observada en ciego también se vio reflejada en los resultados de cecotrofos para el tiempo 2, pues se detectaron tanto concentraciones de ácido acético como de propiónico; a pesar de que se detectaron concentraciones de ácido butírico en contenido cecal, a nivel de cecotrofos no se observó debido a su absorción a nivel de colon ya explicada anteriormente.

En el tiempo 3 (69 días de edad), el perfil de AGV's se mantuvo excepto para el tratamiento 2, donde la concentración de ácido propiónico fue mayor que la de butírico en contenido cecal.

En relación a los cecotrofos, este muestreo fue el único en el que se obtuvo una lectura de ácido butírico, pudiéndose explicar por la aparición de alguna patología que

impidiera la absorción del butirato en colon, pues es de resaltar que dicho valor fue de un solo individuo.

El efecto probiótico del género *Bacillus* radica en que al ser un microorganismo extraño, estimula la inmunidad local, además de que se ha propuesto que sus metabolitos hacen menos favorable el ambiente para los microorganismos patógenos (Bush, 2004). Pudiera ser que los efectos benéficos de este probiótico son a largo plazo en el conejo y por eso se observaron hasta el tercer muestreo, sin embargo estadísticamente no se encontró efecto alguno en la utilización o no del *Bacillus subtilis* como probiótico en conejos sanos canulados en etapa de crecimiento, a nivel de AGV's en contenido cecal y cecotrofos.

6.3 BACTERIAS TOTALES

6.3.1 Contenido Cecal

Se encontraron diferencias ($p < 0.01$) en la concentración promedio de bacterias totales entre el grupo que recibió probiótico y el que no lo recibió. También se encontraron diferencias ($p < 0.01$) en la concentración promedio de bacterias totales entre el tiempo 1 y 2.

6.3.2 Cecotrofos

Contrario al contenido cecal, no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) por la presencia o no de probiótico, en la concentración promedio de bacterias totales en cecotrofos ni tampoco entre tiempos, ni por la interacción de ambos.

Las medias por mínimos cuadrados y errores estándar, para bacterias totales (BT) en contenido cecal y cecotrofos de los grupos con y sin complementación de probiótico, se aprecian en el cuadro 8.

CUADRO 8. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE BACTERIAS TOTALES EN CONTENIDO CECAL Y CECOTROFOS DE CONEJOS CANULADOS POR TRATAMIENTO

PROBIÓTICO	CONTENIDO CECAL	CECOTROFOS
	MMC ± EE	MMC ± EE
No	0.95 ± 0.08 ^a	1.14 ± 0.15 ^a
Si	1.33 ± 0.08 ^b	1.08 ± 0.15 ^a

Valores expresados como Número de BT x10¹⁰/gramo contenido cecal
 Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.01)
 p>0.05 para BT en cecotrofos
 MMC = Medias por Mínimos Cuadrados
 EE = Error Estándar

Las concentraciones promedio de bacterias totales en contenido cecal y cecotrofos por tratamiento a través del tiempo, se pueden presentar en el cuadro 9.

CUADRO 9. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE BACTERIAS TOTALES EN CONTENIDO CECAL Y CECOTROFOS DE CONEJOS CANULADOS POR TRATAMIENTO POR TIEMPO

		TIEMPO 1		TIEMPO 2		TIEMPO 3	
		COLLARÍN					
		Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin
		MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE	MMC ± EE
CONTENIDO CECAL							
PROBIÓTICO	Con	2.39 ± 0.31	1.99 ± 0.31	0.75 ± 0.20	1.21 ± 0.20	0.76 ± 0.15	0.85 ± 0.15
	Sin	1.73 ± 0.31	1.12 ± 0.31	0.93 ± 0.20	0.76 ± 0.20	0.50 ± 0.15	0.68 ± 0.15
CECOTROFOS							
PROBIÓTICO	Con	1.26 ± 0.38		1.10 ± 0.16		0.88 ± 0.16	
	Sin	1.58 ± 0.38		0.96 ± 0.16		0.87 ± 0.16	

Valores expresados como Número de BT x10¹⁰/gramo contenido cecal
 p<0.01 para BT entre complementación y no complementación con probiótico en contenido cecal
 p<0.01 para BT entre tiempo 1 y 2 en contenido cecal
 p>0.05 para BT en cecotrofos
 MMC = Medias por Mínimos Cuadrados
 EE = Error Estándar

6.4 BACTERIAS CELULOLÍTICAS

Para el caso de bacterias celulolíticas, en el presente estudio no se presentó crecimiento con los medios de cultivo utilizados.

Recordando que conforme el gazapo crece y comienza a consumir alimento sólido, a la par se inicia la colonización del ciego con lo que las cuentas bacterianas aumentan, de ahí la diferencia encontrada entre el tiempo 1 y el tiempo 2 del conteo total de bacterias.

Por otro lado, el aumento de la cantidad de bacterias totales en los tratamientos que recibieron el probiótico, nos indica que el *Bacillus subtilis* pudo inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, favoreciendo la proliferación de bacterias con actividad amilolítica, apoyándonos en que no se obtuvo evidencia de crecimiento de bacterias celulolíticas en este estudio.

En general, la actividad fibrolítica cecal es más baja para celulosa que para hemicelulosa y pectinas (Carabaño *et al.*, 2006). Según Fortun-Lamothe y Gidenne (2006) y Padilha (1995), la microbiota amilolítica ya se encuentra activa a las dos semanas de edad y se estabiliza entre los 15 y 49 días de edad, contrario a la fibrolítica que no es detectable a tan temprana edad. De acuerdo a estos mismos autores, la actividad celulolítica cecal alcanza progresivamente su máximo nivel alrededor de los 35 días y se mantiene estable a partir de entonces, y según Padilha *et al.* (1995) ésta no se desarrolla hasta el consumo de alimento fibroso; el pico de actividad celulolítica coincide con la etapa de destete donde persiste un ambiente cecal más anaerobio (Carabaño *et al.*, 2006); en el caso del presente estudio desde el primer muestreo donde aún no había inclusión del probiótico, no se encontró crecimiento de bacterias celulolíticas, que en general son anaerobias (Carabaño *et al.*, 2006), por lo que pudiera ser que la canulación, a pesar de presentarse fugas evidentes, rompió con ese ambiente anaerobio necesario para el crecimiento de las bacterias celulolíticas.

Otra posibilidad del nulo crecimiento de bacterias celulolíticas, pudiera estar en que las características del medio utilizado no fueron las apropiadas, pues aunque Boulahrouf *et al.* en 1991 demostró que las bacterias cecales son capaces de crecer con papel de celulosa como sustrato, y Cobos-Peralta y colaboradores (2004) aislaron bacterias cecales con el mismo medio que el del presente estudio, de acuerdo a Crociani *et al.* (1984), los géneros pertenecen a bacterias anaerobias ureolíticas.

Emaldi y colaboradores (1979) demostraron que la microbiota del contenido cecal y de los cecotrofos es similar, de ahí que en estos últimos tampoco se encontraran bacterias celulolíticas; para el caso de bacterias totales no hubo ningún efecto a pesar de que en contenido cecal sí hubo un aumento; pudiera ser que el incremento de bacterias totales se haya traducido en un aumento de proteína microbiana, y no como tal en el conteo de bacterias totales.

6.5 GANANCIA DE PESO

No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) para la ganancia de peso por conejo entre tratamientos ni para cada uno de los factores en estudio. Sin embargo, sí se encontró una diferencia significativa ($p < 0.01$) en esta variable a través del tiempo, lo cual era de esperarse debido al crecimiento de los conejos. En el cuadro 10 se pueden observar los pesos promedio iniciales y finales por tratamiento, así como la ganancia diaria de peso promedio y sus errores estándar.

El peso promedio al sacrificio para conejos sin canular a la edad de 74 días reportado por Lebas (2009), es de 2.47 kg, mientras que los valores de este estudio no superaron los 2.1 kg a los 77 días de edad, valor que se relaciona directamente con los datos obtenidos sobre el consumo de alimento.

Para el parámetro productivo de ganancia diaria de peso, Martínez (2004) menciona un rango de 33 a 42 g/d en conejos sin canular (promedio 38 g/d), mientras que De Blas

(1998) reportó ganancias de 38 a 49 g/d; como se puede observar los valores encontrados en el presente trabajo son menores a los reportados, recordando que son conejos canulados por lo que se puede inferir que la canulación sí tiene un efecto en detrimento de la ganancia diaria de peso, sin embargo, hablando de conejos canulados experimentalmente a nivel de la 13^{ava} asa cecal, Anaya (2013) encontró ganancias diarias de peso entre 20 g y 26.1 g según el material de la cánula, mientras que Conde (2012) observó ganancias diarias de pesos entre 24.61 g y 37.21 g, siendo los resultados del presente estudio similares, por lo que realmente no hubo como tal un efecto positivo en la ganancia diaria de peso de conejos canulados a nivel de la 13^{ava} asa cecal, que fueron complementados con *Bacillus subtilis* como probiótico.

CUADRO 10. PESOS PROMEDIO DE CONEJOS CANULADOS POR TRATAMIENTO

TRATAMIENTO	PESO		GANACIA DIARIA DE PESO PROMEDIO
	INICIAL	FINAL	
	MEDIA ± EE	MEDIA ± EE	MEDIA ± EE
Con probiótico/sin collarín	725.0 ± 55.91	1911.0 ± 115.28	28.24 ± 2.39
Con probiótico/con collarín	942.0 ± 55.91	1978.4 ± 115.28	24.70 ± 2.39
Sin probiótico/sin collarín	779.4 ± 55.91	2100.2 ± 115.28	31.45 ± 2.39
Sin probiótico/con collarín	859.0 ± 55.91	1902.4 ± 115.28	24.84 ± 2.39
<i>Valores expresados en gramos</i> <i>p>0.05 para ganancia de peso entre tratamientos</i> <i>p<0.01 para ganancia de peso a través del tiempo</i> <i>EE = Error Estándar</i>			
		<i>Peso Inicial a la edad de 35 días</i> <i>Peso Final a la edad de 77 días</i>	

6.6 CONSUMO DIARIO DE ALIMENTO

No se encontraron diferencias significativas en el consumo promedio entre tratamientos, ni para alguno de los factores estudiados ($p>0.05$). En este caso tampoco se encontraron diferencias significativas entre tiempos ($p>0.05$).

El consumo de alimento diario promedio por individuo por tratamiento por semana de estudio, se puede observar en el cuadro 11.

**CUADRO 11. CONSUMO DE ALIMENTO DIARIO PROMEDIO POR CONEJO CANULADO
POR TRATAMIENTO POR SEMANA**

TRATAMIENTO	CONSUMO DE ALIMENTO DIARIO PROMEDIO					
	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6
Con probiótico y sin collarín	77.54	100.51	92.60	110.23	127.49	114.26
Con probiótico y con collarín	84.94	94.97	92.29	94.60	121.94	123.14
Sin probiótico y sin collarín	90.60	109.71	107.17	118.97	124.20	135.20
Sin probiótico y con collarín	86.57	105.69	111.71	111.03	118.71	117.94
<i>Valores expresados en gramos</i>						
<i>p>0.05 para consumo de alimento por individuo entre tratamientos</i>						

De acuerdo a Fortun-Lamothe y Gidenne (2006), el consumo de alimento promedio de gazapos en crecimiento a las cuatro semanas de edad (28 días) es de alrededor de 35 g de alimento seco, mientras que a las 8 semanas (56 días) consumen alrededor de 87 g; comparándolo con estos datos, el consumo de los conejos utilizados en el presente estudio a la semana 4 fue mayor. Sin embargo, comparándolo con el reporte de De Blas (1998), los consumos de conejos canulados a nivel de la 13^{ava} asa cecal encontrados en el presente estudio y por Conde (2012) –ver cuadro 12-, resultaron menores que los de conejos de la misma edad sin canular. El efecto de la canulación sobre el consumo de alimento ya había sido señalado por Guidenne *et al.* (1994), donde conejos canulados a nivel ileal, presentaron consumos menores que conejos sin canular.

CUADRO 12. COMPARACIÓN DEL CONSUMO DE ALIMENTO PROMEDIO POR DÍA POR INDIVIDUO

EDAD	<i>De Blas, 1998</i>	<i>Conde, 2012</i>
30 a 37 días	74	**
37 a 44 días	102	**
44 a 51 días	132	110.06
51 a 58 días	147	147.68
58 a 65 días	165	146.70
65 a 72 días	176	145.15
<i>Valores expresados en gramos</i>		<i>**No estudiado</i>

6.7 CONVERSIÓN ALIMENTICIA

No se encontraron diferencias estadísticas en la conversión alimenticia promedio entre tratamientos, ni para alguno de los factores estudiados ($p > 0.05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre tiempos ($p > 0.05$). Las medias por mínimos cuadrados y sus errores estándar por tratamiento, se presentan en el siguiente cuadro:

CUADRO 13. CONVERSIÓN ALIMENTICIA PROMEDIO DE CONEJOS CANULADOS POR TRATAMIENTO

TRATAMIENTO	CONVERSIÓN ALIMENTICIA
	MMC \pm EE
Con probiótico y sin collarín	3.80 \pm 2.48
Con probiótico y con collarín	4.30 \pm 2.35
Sin probiótico y sin collarín	3.70 \pm 2.34
Sin probiótico y con collarín	4.08 \pm 2.35
$p > 0.05$	MMC = Medias por Mínimos Cuadrados EE = Error Estándar

En el cuadro 14 se puede observar un comparativo por edad, de las conversiones alimenticias del presente estudio y algunos reportes de México, entre conejos no canulados (Martínez, 2004) y conejos canulados a nivel de la 13^{ava} asa cecal (Conde 2012).

CUADRO 14. COMPARACIÓN DE LA CONVERSIÓN ALIMENTICIA SEMANAL DE CONEJOS NO CANULADOS Y CANULADOS A NIVEL DE LA 13^{ava} ASA CECAL

SEMANA	REPORTE		
	<i>Martínez, 2004</i>	<i>Conde, 2012</i>	<i>Este Estudio</i>
1	2.71	**	3.31
2	2.49	3.02	3.57
3	3.05	6.62	3.78
4	4.19	6.22	4.40
5	4.68	4.71	4.60
6	5.70	**	5.53
EDADES (días)	<i>Semana 1 35-42 Semana 2 42-49 Semana 3 49-56 Semana 4 56-63 Semana 5 63-70 Semana 6 70-77</i>	<i>Semana 2 44-51 Semana 3 51-58 Semana 4 58-65 Semana 5 65-72</i>	<i>Semana 1 35-42 Semana 2 42-49 Semana 3 49-56 Semana 4 56-63 Semana 5 63-70 Semana 6 70-77</i>

**No Reportado

En general, la conversión alimenticia reportada de los conejos no canulados fue mejor que para los canulados, por lo que sí existe un efecto negativo de la canulación sobre esta variable, relacionado al aspecto del consumo de alimento, como se mencionó anteriormente. Solamente para las semanas 5 y 6 de edad, se aprecia que las conversiones alimenticias de los conejos canulados fueron mejores que las reportadas en conejos sin canular; esto pudiera explicarse por el fenómeno de crecimiento compensatorio, pues durante el periodo de adaptación a la cánula los nutrientes fueron destinados para la reparación del tejido circundante a la misma.

6.8 RENDIMIENTO EN CANAL

No se encontraron diferencias significativas en el promedio de rendimiento en canal ($p>0.05$) debido a la presencia del collarín, ni tampoco debida a la adición de probiótico, ni por su interacción. Las medias por mínimos cuadrados y sus errores estándar por tratamiento aparecen en el cuadro 15.

CUADRO 15. RENDIMIENTO EN CANAL PROMEDIO DE CONEJOS CANULADOS POR TRATAMIENTO

TRATAMIENTO	RENDIMIENTO EN CANAL
	MMC ± EE
Con probiótico y sin collarín	49.36 ± 1.09
Con probiótico y con collarín	49.51 ± 1.09
Sin probiótico y sin collarín	49.86 ± 1.09
Sin probiótico y con collarín	49.43 ± 1.09
<i>Valores expresados en % p>0.05</i>	
<i>MMC = Medias por Mínimos Cuadrados EE = Error Estándar</i>	

De acuerdo a Lebas (2009) el rendimiento en canal para Francia es de 57.4%, mientras que Martínez (2004) reporta para México un rendimiento en canal entre 50% y 60% (promedio 55%), hablando en ambos casos de conejos en etapa de engorda sin canular.

Comparado con ambas referencias, los rendimientos en canal encontrados en el presente estudio se encuentran por debajo de lo esperado.

Asimismo, la adición de *Bacillus subtilis* como probiótico en conejos en etapa de engorda canulados a nivel de la 13^{ava} asa cecal, no mejoró el rendimiento en canal comparado con animales sin canular.

7. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales empleadas en el presente estudio, se puede concluir que la técnica de canulación y la cánula desarrollada permiten la toma de muestras de contenido cecal de conejos hasta por 49 días, con lo que se favorece la utilización más eficiente de los recursos animales para el estudio de variables a nivel de contenido cecal. Sin embargo, se sugiere la evaluación de otros parámetros fermentativos cecales con dicha cánula, para evaluar certeramente el efecto sobre el entorno anaerobio cecal.

Se encontró que la utilización de *Bacillus subtilis* como probiótico, a dosis de 24×10^8 UFC/día en la alimentación de conejos sanos canulados a nivel de la 13^{ava} asa cecal en etapa de crecimiento, no tienen ningún efecto sobre la producción de ácidos grasos volátiles y bacterias celulolíticas, así como sobre su comportamiento productivo (consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia y rendimiento en canal), no así para el conteo de bacterias totales, el cual se incrementó.

8. REFERENCIAS

- NOM-033-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana. Sacrificio humanitario de los animals domésticos y silvestres.
- NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Alves P.C., Ferrand N., Hackländer K. Lagomorph biology. Evolution, ecology and conservation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2008
- Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Martínez M.A. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 45 (2006) 91–95.
- Anaya LM. Determinación *in vivo* de parámetros fermentativos de contenido cecal en conejos canulados por diferentes técnicas y la evaluación de éstas. (Tesis de Maestría). Distrito Federal México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- Bellier R, Gidenne T, Vernay M, Colin M. In vivo study of circadian variations of the caecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *J. Anim. Sci.* 1995;73:128-135.
- Bellier R, Gidenne T. Consequences of reduced fibre intake on digestion, rate of passage and caecal microbial activity in the young rabbit. *Br. J. Nutr.* 1996;75:353-363.
- Bergman, E. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews.* (1990) 70:2, 567-590.
- Blas Falcao M, Gidenne T, Scapinello C, Pinheiro V, García AI, Carabaño, R. Interlaboratory study on ileal digestibility in rabbits: The effect of digesta collection time and a simplification of the procedure. *World Rabbit Sci.* 2003;11;101-11.

- Boulahrouf A., Fonty G., Gouet P. Establishment counts and identification of the fibrolitic microflora in the digestive tract of rabbits. Influence of feed cellulose content. *Current Microbiology*. 1991. 22, 21-25.
- Bush A., Herrmann H.H., Kühn I., Simon O., Struck J., Süphke E. Probiotics in animal nutrition. *Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung*. 2004
- Cabrera R., López A., Morales S., Salazar H., Fuentes A.M. Fistulación y canulación permanente del compartimento 1 (rumen) en llamas (*Lama glama*). *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2000 32:1, 131-138.
- Carabaño R., Badiola I., Licois D., Guidene T. The digestive ecosystem and its control through nutritional or feeding strategies in *Recent Advances in Rabbit Science*. (2006), 221-228.
- Carabaño R., Piquer J., Menoyo D. Badiola I. The digestive system of the rabbit in *Nutrition of the rabbit* (2010), 1-18.
- Carman R. J., Waynforth H.B. Chronic fistulation and cannulation of the rabbit caecum. *Lab. Anim*. 1984, 18(3): 258-260.
- Cervantes M, González V, Rodríguez S, González JS, Flores L. Canulación duodenal e ileal para estudios de digestión en cerdos. *Agrociencia*. 2000:34(2);135-39.
- Cheeke PR, Hollister AG, Robinson KL. Improving feed efficiency and reducing mortality in rabbits: A case study for use in all species. In: Lyons TP, editor. *Biotechnology in Feed Industry*. Nicholasville Kentucky USA: Alltech Technical Publications, 1989: 253-259.
- Cobos-Peralta M.A., Gutiérrez-Olvera C., Hernández-Sánchez D., González-Muñoz S.S., Mendoza-Martínez G. Aislamiento y Caracterización de dos Bacterias Cecales con Potencial de Uso en la Alimentación del Conejo. *Vet. Méx.*, 35:2(2004) 109-120.

- Cobos-Peralta M.A., Mata-Espinosa M.A., Pérez-Sato M., Hernández-Sánchez D., Ferrera-Cerrato R. Envases de Polietilentereftalato Molidos y su Función como Sustituto de Fibra en la Dieta de Borregas. *Agrociencia*, 45:1(2011) 33-41.
- Conde CA. Contenido de nutrientes en cecótrofos y evaluación de variables productivas de conejos canulados en apéndice cecal, décimo tercer asa cecal y colon distal. (Tesis de Maestría). Distrito Federal México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
- Crociani F., Biavati B., Castagnoli P. Matteuzi D. Anaerobic ureolytic bacteria from caecal contents and soft faeces of rabbits. *J. Appl. Bacteriol.* 1984. 57, 83-88.
- Cutting SM. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* 28 (2011) 214-220.
- Davies RR, Davies JA. Rabbit gastrointestinal physiology. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 6; 1: 139 – 153, 2003.
- De Blas C., Wiseman, J. The nutrition of the rabbit. University of Nottingham. Division of Agriculture and Horticulture. U.K., 1998.
- Dibner J.J., Richards J. D. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. *Poultry Science* 84 (2005) 634–643.
- Dihigo LE. La cirugía experimental al servicio de las investigaciones en animales monogástricos. 2012 Revista Computadorizada de Producción Porcina. Vol. 19. No. 1, 9-13.
- Dihigo LE, Savón L y Rodríguez V. Cirugía experimental de animales monogástricos. Retos y perspectivas. IV Encuentro de Nutrición sobre animales monogástricos: 1997 julio 8-21; La Habana, Cuba. Cuba: Instituto de Ciencia Animal. <http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/ivencuentro/dihigo.htm>
- Emaldi O., Crociani F., Matteuzzi D. Bacteria in the caecal content, soft and hard feces of rabbit. *J. Appl. Bacteriol.* 1979. 46, 169-172.

- Falcão-e-Cunha L., Castro-Solla L., Maertens L., Marounek M., Pinheiro V., Freire J., Mourão J.L. Alternatives To Antibiotic Growth Promoters In Rabbit Feeding: A Review. *World Rabbit Sci.* 15 (2007) 127 – 140.
- Fortun-Lamothe L., Boullier S. (2007) A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livestock Science* 107, 1–18.
- Fortun-Lamothe L., Gidenne T. Recent advances in the digestive physiology of the growing rabbit in *Recent Advances in Rabbit Science.* (2006), 221-228.
- Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 141 (2010) S15–S28.
- García, J., Gidenne, T., Falcao E Cunha, L. and de Blas, J.C. (2002) Identification of the main factors that influence caecal fermentation traits in growing rabbits. *Animal Research* 51, 165–173.
- Gidenne T., Blas E., Carabaño R., Merino J.M. Effect of ileal cannulation on rabbit digestion and caecotrophy: An interlaboratory study. *World Rabbit Science* 1994:2(3);102-106
- Gidenne T., Jehl N., Segura M., Michalet-Doreau B. Microbial activity in the caecum of the rabbit around weaning: impact of a dietary fibre deficiency and of intake level. *Anim. Feed Sci. and Technol.* (2002) 99, 107–118.
- Gidenne T., Lebas F., Fortun-Lamothe L. Feeding behavior of rabbits. *Nutrition of the rabbit.* (2010), 233-252.
- Gutiérrez OC, *et al.* Respuesta productiva, fermentación cecal y morbilidad diarreaica en conejos alimentados con complementos bacterianos de *Clostridium sordelli* y *Peptostreptococcus tetradius*. *Vet. Méx.* 39:4 (2008), 397-410.

- Hernández-Sánchez D., Cobos-Peralta M.A. Digestibilidad *in vitro*, población de bacterias celulolíticas y totales del apéndice cecal, ciego y colon del conejo. Técnica Pecuaria en México. México 2001 Vol 39 num. 3 229-236.
- Hoffmann R.S., Smith A.T. Lagomorphs. En: Wilson D.E., Reeder D.M. Mammal species of the world. 3th Ed., 2007. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Holzapfel W.H., Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics. Food Research International 35 (2002) 109–116.
- Hong H., Khaneja R., Tam N., Cazzato A., Tan S., Urdaci M., Brisson A., Gasbarrini A., Barnes I., Cutting SM. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. Res. Microbiol. 160 (2009) 134-143.
- Jehl N., Gidenne T., Le Roux J.F. Measurement of the bacterial fibrolytic activity in the caecum and in the soft faeces of the rabbit. En: Lebas F. (Ed.), Proc. 6th World Rabbit Congr., Toulouse, France. Vol. 1, 199-203.
- Leary A.M. Popular Alternatives to Antibiotic Feed Additives in Monogastric Production Systems. Aust. Poult. Sci. Symp. 19 (2007) 145-148.
- Lebas F, Coudert P, de Rochambeau H, Thébault RG, 1997. En: The Rabbit – Husbandry, Health and Production (2d edition) FAO publ., Roma, 223 pp.
- Marteau P. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 17, 5 (2003) 725–740.
- Martínez M.A. Aparato Digestivo en Cunicultura. 2^{da} ed. U.N.A.M, F.M.V.Z., División Educación Continua, México, 2004. 36-47
- Marty J., Vernay M. Absorption and Metabolism of the volatile fatty acids in the hind-gut of the rabbit. Br. J. Nutr. (1984) 51, 265-277.

- Mazza P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. Boll. Chim. Farm. (1994) 133 3-18.
- Michelland R., *et al.* Rapid adaptation of the bacterial community in the growing rabbit caecum after a change in dietary fibre supply. Animal 5:11 (2011), 1761–1768.
- Mora-Valverde D. Uso de la morera (*Morus alba*) en la alimentación del conejo. El rol de la fibra y la proteína en el tubo digestivo. Agronomía Mesoamericana (2010)21:2, 357-366.
- Nicodemus, N., García, J., Carabaño, R. and de Blas, J.C. Effect of inclusion of sunflower hulls in the diet on performance, disaccharidase activity in the small intestine and caecal traits of growing rabbits. Animal Science (2002) 75, 237–243.
- Orengo, O., Gidenne, T. (2007) Feeding behavior and caecotrophy in the young rabbit before weaning: An approach by analysing the digestive contents. Applied Animal Behaviour Science 102, 106–118.
- Padilha M.T.S., Licois D., Gidenne T., Carré B., Fonty G. Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. Reprod. Nutrit. Develop. 1995. 35, 375-386.
- Parker D.S., McMillan R.T The determination of volatile fatty acids in the caecum of the conscious rabbit. Br J Nutr. 1976, 35(3):365-371.
- Parra J, Gómez A. Importancia de la utilización de diferentes técnicas de digestibilidad en la nutrición y formulación porcina. Revista MVZ Córdoba. 2009:14(1);1633-1641
- Portela D. Evaluación *in vitro* de subproductos agrícolas y plantas con capacidad desfaunante sobre la producción de metano. (Tesis de Maestría). Montecillo, Texcoco (Estado de México) México: Colegio de Posgraduados, 2012.

- Portsmouth, J.I. The nutrition of the rabbits. In: Haresign, W., Swan, H. and Lewis, D. (eds) Nutrition and the Climatic Environment. Butterworths, London, UK, (1977) 93–111.
- Rodríguez De Lara R., *et.al.* Studies on the evolution, pathology and immunity of commercial fattening rabbits affected with epizootic outbreaks of diarrhoeas in Mexico: a case report. Research in Veterinary Science. 84 (2008), 257-268.
- Sanders M.E., Morelli L., Tompkins T.A. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2 (2003) 101-110.
- Snipes R.L., Clauss, W., Weber A. and Hörnicke H. Structural and functional differences in various divisions of rabbit colon. Cell and Tissue Research (1982) 225, 331–346.
- Stevens C. E., Hume I.D. Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients. Physiological Reviews (1998) 78:2, 393-427.
- Tejero-Sariñena S., Barlowb J., Costabile A., Gibson G.R., Rowland I. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. Anaerobe 18 (2012) 530-538.
- Van Soest P. Impact of feeding behavior and digestive capacity on nutritional response. Technical Consultation on Animal Genetics Research Conservation and Management. 1980
- Vasiljevic T., Shah N.P. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal 18 (2008) 714–728.
- Verstegen M.W., Williams B.A. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. Anim Biotechnol. 13,1 (2002) 113-127.
- von Engelhardt W., Bartels J., Kirschberger S., Meyer zu Düttingdorf H.D., Busche R. Role of short-chain fatty acids in the hind gut. Veterinary Quarterly. (1998) 20:3, 52-59.

Wenk C. Growth promoter alternatives after the ban on antibiotics. Pigs News and Information. 24 (2003) 11N-16N.