

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



**“DIETAS BAJAS EN PROTEÍNA SUPLEMENTADAS CON AMINOÁCIDOS
PARA CERDOS EN CRECIMIENTO: SOBRE EL EFECTO DE LA EXPRESIÓN
DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS, CONCENTRACIÓN SÉRICA,
DESARROLLO Y COMPOSICIÓN DE LA CANAL”**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

GILBERTO CASTILO LUNA

DIRECTOR

DR. MIGUEL CERVANTES RAMIREZ

EJIDO NUEVO LEON, MEXICALI B. C.

MAYO DEL 2017

La presente tesis "DIETAS BAJAS EN PROTEÍNA SUPLEMENTADAS CON AMINOÁCIDOS PARA CERDOS EN CRECIMIENTO: SOBRE EL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS, CONCENTRACIÓN SÉRICA, DESARROLLO Y COMPOSICIÓN DE LA CANAL" realizada por el C. GILBERTO CASTILLO LUNA, dirigido por el DR. MIGUEL CERVANTES RAMIREZ, hasido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, comorequisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Comité Particular



Dr. MIGUEL CERVANTES RAMIREZ
Director de Tesis



Dra. ADRIANA MORALES TREJO
Secretaria



Dr. ERNESTO AVELAR LOZANO
Sinodal



Dr. BENEDICTO ALFONSO ARAIZA PIÑA
Sinodal



DR. JORGE LUIS YANEZ HERNÁNDEZ
SINODAL

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN GENERAL	VIII
GENERAL ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Proteína intacta en alimento como parte de la nutrición animal.....	3
2.2 Importancia de los aminoácidos funcionales para la alimentación de cerdos 4	
2.2.1 Arginina como AA funcional.....	5
2.2.2 Leucina como AA funcional	6
2.2.3 Isoleucina y valina como AA funcional.....	6
2.3 Composición de la canal de cerdos	6
2.4 Actividad enzimática pancreática en cerdos	8
2.5 Absorción intestinal y transporte de aminoácidos	13
3. CAPITULO 1.....	16
3.1 Dietas bajas en proteína suplementadas con aminoácidos para cerdos en crecimiento: efecto en la expresión de transportadores de aminoácidos, concentración sérica, desarrollo y composición de la canal.....	16
ABSTRACT	16
RESUMEN	18
3.2 INTRODUCCIÓN	20
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.3.1 Animales, instalaciones y tratamientos dietéticos	21
3.3.2 Disección de la canal y toma de muestra sanguínea.....	24
3.3.3 Extracción y purificación de ARN total	25
3.3.4 Transcripción reversa y PCR cuantitativo	26
3.3.5 Análisis de AA en las dietas y AA libres en suero	28
3.3.6 Análisis estadístico.....	29
3.4 RESULTADOS	29
3.4.1 Rendimiento del crecimiento	29
3.4.2 Peso de componentes de la canal y órganos	30
3.4.3 Expresión de genes	34

3.4.4 Concentración de AA en suero	36
3.5 DISCUSIÓN	37
4. CAPITULO 2.....	45
4.1 Los niveles de proteína y aminoácidos libres en la dieta afectan la actividad de proteasas pancreáticas, expresión de transportadores de aminoácidos y concentración de aminoácidos en suero de cerdos en iniciación.....	45
ABSTRACT	45
RESUMEN	46
4.2 INTRODUCCIÓN	47
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	48
4.3.1 Animales, instalaciones y dietas experimentales	48
4.3.2 Colección de tejidos y muestras sanguíneas	51
4.3.3 Actividad enzimática	51
4.3.4 Extracción y purificación de ARN total	52
4.3.5 Transcripción reversa y PCR cuantitativo	52
4.3.6 Análisis de AA en las dietas y AA en suero	55
4.3.7 Análisis estadístico.....	55
4.5 RESULTADOS	56
4.5.1 Actividad enzimática	56
4.5.2 Expresión de genes	57
4.5.3 Concentración sérica de aminoácidos	59
4.6 DISCUSIÓN	61
4.7 CONCLUSIÓN	66
5. CONCLUSIÓN GENERAL.....	67
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química (%) del cerdo en diferentes pesos	7
Cuadro 2. Composición de dietas experimentales (Base tal como se ofrece).....	22
Cuadro 3. Análisis de la composición de AA de las dietas experimentales (base tal como se ofrece).....	24
Cuadro 4. Oligonucleótidos para análisis de expresión de ARNm de los transportadores de AA b ^{0,+} , y ^{+L} , B ⁰ y ARNr 18S.....	28
Cuadro 5. Efecto del nivel de PC y de (Libre vs. Unido a proteína) de AA en dietas trigo pasta de soya sobre la GDP, CDA y G:C de cerdos en crecimiento	30
Cuadro 6. Peso final (kg) y contenido relativo (% del peso de la canal) de los componentes de la canal de los cerdos en crecimiento ¹	31
Cuadro 7. Efecto del tratamiento dietético sobre la ganancia de peso de los componentes de la canal, canal completa y acumulación diaria total de proteína en cerdos (g/d) ¹	32
Cuadro 8. Efecto del tratamiento dietético sobre el peso de órganos viscerales de cerdos ¹	33
Cuadro 9. Expresión intestinal de transportadores de AA catiónicos y neutros en cerdos en crecimiento alimentados con dietas bajas en proteína (14%) suplementadas con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen (BPAA) y con una dieta alta en proteína (AP) (22%) sin suplementación de AA libres (Unidades arbitrarias).....	34
Cuadro 10. Concentración sérica post-prandial (mg/100mL) de AA libres de cerdos en crecimiento alimentados con una dieta baja en PC (14%) suplementación de la dieta con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen (BPAA) y dieta alta en proteína (AP) (22%) no suplementada con AA libres.....	37
Cuadro 11. Composición de las dietas experimentales.....	49
Cuadro 12. Composición analizada de PC y AA de las dietas experimentales BP suplementada con AA y dieta AP (base tal como se ofrece).....	50
Cuadro 13. Oligonucleótidos para análisis de PCRq de ADNc derivado del ARNm de transportadores de AA b ^{0,+} , y ^{+L} , B ⁰ y ARNr 18S de cerdo.....	54

Cuadro 14. Expresión de transportadores de AA en intestino delgado de cerdos en iniciación alimentados con la dieta BPAA o AP (Unidades arbitrarias, proporción de moléculas del ARNm: ARNr 18S).....	58
Cuadro 15. Concentración post-prandial de AA libres (mg/100mL) en cerdos en iniciación alimentados con la dieta BPAA o AP.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Activación de enzimas digestivas intestinales. Las proenzimas inactivas llamadas zimógenos entran en el duodeno donde la enteroquinasa que está unida en la superficie intestinal del enterocito se une con el zimógeno y activa tripsina. La tripsina, a su vez, convierte los zimógenos incluyendo el propio tripsinógeno a su forma enzimática activa mediante ruptura enzimática. Pandolf S. J. The Exocrine Pancreas. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Digestive Enzymes. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54127	10
Figura 2. Modelo hipotético de mamífero asociado a proteínas transportadoras de AA catiónicos en células epiteliales de intestino delgado. La localización subcelular y la dirección predominante del flujo del sustrato se representa para cada unidad de transporte AA+= AA catiónico; AA0,+ = AA catiónico y neutral; CysC= Cistina (Liao et al., 2009)	14
Figura 3. Expresión relativa de transportadores de AA b ^{0,+} , y ^{+L} , y B ⁰ en yeyuno, expresada en porcentaje de su expresión en duodeno o íleon en los ocho cerdos alimentados con dieta baja en PC (14%) suplementación de la dieta con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen (BPAA) y dieta alta en proteína (AP) (22%) no suplementada con AA libres.	35
Figura 4. Actividad de tripsina y quimotripsina en duodeno y yeyuno de cerdos alimentados con la dieta BP suplementada con AA o la dieta AP. La interacción dieta X segmento intestinal no fue significativa (P> 0.05) para ambas enzimas.	57
Figura 5. Expresión de transportadores de AA b ^{0,+} AT y B ⁰ AT1 en duodeno (D), yeyuno (Y), e íleon (I) de cerdos alimentados con la dieta baja en proteína	

suplementada con AA libres (BPAA) y la dieta alta en proteína no suplementada con AA libres (AP) (Unidades arbitrarias, proporción de moléculas del ARNm: ARNr 18S). La interacción dieta x segmento intestinal fue significativa ($p < 0.05$) para ambos transportadores de AA..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
Ala	Alanina
AP	Alta en proteína
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
B ⁰	Transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio
b ⁰⁺	Transportador de AA catiónicos y neutros independiente de sodio
BP	Baja en proteína
BPAA	Baja en proteína y adicionada con aminoácidos
BPAA+N	Baja en proteína y adicionada con AA más nitrógeno no esencial
CS	Concentración de AA en suero
dNTP	Dinucleótidos trifosfatados
EA	Eficiencia Alimenticia
Fen	Fenilalanina
Gli	Glicina

GDP	Ganancia diaria de peso
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutámico
His	Histidina
Iso	Isoleucina
Leu	Leucina
I	Íleon
Y	Yeyuno
D	Duodeno
Lis	Lisina
Met	Metionina
N	Nitrógeno
PC	Proteína cruda
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real
Pro	Prolina
Ser	Serina
Tre	Treonina
Trp	Triptófano
Val	Valina
y ⁺ L	Transportador de aminoácidos catiónicos y neutros

RESUMEN GENERAL

La utilización de aminoácidos para dietas de cerdos a base de trigo-pasta de soya puede ser una alternativa de alimentación y aprovechamiento de la producción porcina. Se utilizaron 48 cerdos (24.3 kg de P.V) aleatorizados en 4 tratamientos para evaluar el efecto del nivel de PC y la suplementación de AA libres o unido a proteína en dietas trigo-pasta de soya, 1) Bajo en P (BPAA), suplementada con AA; 2) Dieta BPAA mas Gli como fuente de N (BPAA+N); 3) Nivel de P medio MPAA; y 4) Alto en P sin AA libres. 8 cerdos fueron sacrificados al final. No se observaron diferencias en las variables de comportamiento productivo. La expresión de todos los transportadores fue mayor en yeyuno que en duodeno o íleon ($P > 0.05$). La concentración sérica de Arg, His, Iso, Leu, Fen, y Val fue mayor, pero en Lis y Met fue menor en cerdos alimentados con la dieta AP ($P < 0.05$). Las dietas BPAA pueden sustituirse 8 unidades porcentuales de proteína en dietas AP con dietas trigo-pasta de soya sin afectar el desarrollo productivo del cerdo. En el experimento 2 los tratamientos fueron: 1) Dieta baja en proteína (19.2 %) más AA libres (BPAA) y 2) Dieta alta en proteína (28.1%) sin AA libres (AP). Los cerdos alimentados con la dieta AP tuvieron una mayor actividad de tripsina y quimotripsina en duodeno y yeyuno ($P < 0.001$). En general, la actividad de tripsina fue mayor en yeyuno que en duodeno ($P < 0.05$). En la dietas BPAA, la expresión de $b^{0,+}$ y B^0 fue más alta en duodeno ($P = 0.030$) e íleon ($P = 0.011$). Para la dieta BPAA, la expresión de $b^{0,+}$ en duodeno fue más alta que en yeyuno e íleon ($P < 0.01$). En cerdos alimentados con la dieta AP, la expresión de $b^{0,+}$ y B^0 fueron más altas en duodeno y yeyuno comparado con íleon ($P < 0.01$). La CS de Arg fue más alta ($P = 0.011$) con la dieta AP, en comparación con Lis ($P < 0.049$), Met ($P = 0.027$) y Tre ($P = 0.037$) fueron más altos con la dieta BPAA. Por lo tanto, el contenido de proteína en la dieta afecta el grado de digestión de proteína y la suplementación de AA libres puede influenciar el sitio de absorción, el cual puede impactar su disponibilidad para cerdos en crecimiento.

GENERAL ABSTRACT

The use of amino acids for diets of pigs based on wheat-soybean paste can be an alternative of feeding and utilizing pork production. We used 48 pigs (24.3 kg of PV) randomized in 4 treatments to evaluate the effect of PC level and supplementation of free or protein-bound AA in wheat-soybean diets, 1) Low in P (BPAA), supplemented with AA; 2) BPAA plus Gly diet as N source (BPAA + N); 3) MPAA average P level; And 4) High in P without free AA. 8 pigs were slaughtered at the end. There were no differences in the variables of productive behavior. Expression of all transporters was greater in jejunum than in duodenum or ileum ($P > 0.05$). The serum concentration of Arg, His, Ile, Leu, Phe, and Val was higher, but in Lys and Met was lower in pigs fed the AP diet ($P < 0.05$). BPAA diets can be substituted for 8 percent protein in AP diets with wheat-soybean diets without affecting the productive development of the pig. In the experiment 2 the treatments were: 1) Low protein diet (19.2%) plus free AA (BPAA) and 2) High protein diet (28.1%) without free AA (AP). Pigs fed the AP diet had higher trypsin and chymotrypsin activity in duodenum and jejunum ($P < 0.001$). In general, trypsin activity was higher in jejunum than in duodenum ($P < 0.05$). In the BPAA diets, the expression of $b^{0,+}$ and B^0 was higher in duodenum ($P = 0.030$) and ileum ($P = 0.011$). For the BPAA diet, the expression of $b^{0,+}$ in duodenum was higher than in jejunum and ileum ($P < 0.01$). In pigs fed the AP diet, the expression of $b^{0,+}$ and B^0 were higher in duodenum and jejunum compared to ileum ($P < 0.01$). The CS of Arg was higher ($P = 0.011$) with the AP diet, compared to LS ($P < 0.049$), Met ($P = 0.027$) and Tre ($P = 0.037$) were higher with the BPAA diet. Therefore, protein content in the diet affects the degree of protein digestion and free AA supplementation may influence the site of absorption, which may impact its availability for growing pigs.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El propósito principal de la producción de cerdos es proveer proteína de alta calidad para consumo humano, para lo cual es necesario mejorar la nutrición y eficiencia productiva de los cerdos. Una estrategia para conseguir ambos propósitos consiste en diseñar programas de alimentación con dietas bajo el concepto de “proteína ideal”, que se refiere a que la proteína en la dieta, debe tener una adecuada relación de aminoácidos (AA) cubriendo las necesidades del animal. El concepto de proteína toma como referencia a lisina (Lis; Lewis, 2001), que es el primer aminoácido limitante en la mayoría de las dietas con base en cereal-pasta de soya para cerdos (NRC, 2012). Esta estrategia también ayuda a disminuir la contaminación por exceso de nitrógeno (N) ya que en dietas que cubren el 100% de los requerimientos de Lis tienen un exceso del resto de los AA. Entonces, se puede reducir el nivel proteico de la dieta con la suplementación de AA en forma libre (García –Launay *et al.*, 2014). Por lo tanto, es factible mantener la producción mejorando la utilización del nitrógeno cubriendo los requerimientos de AA en la dieta (Gloaguen *et al.*, 2014) y disminuyendo la contaminación ambiental por el exceso de N.

Actualmente a nivel comercial se utiliza la suplementación de Lis, Tre, Trp, y Met con la finalidad de cubrir los requerimientos para el crecimiento de cerdos en dietas a base de cereales-pasta de soya (Lewis, 2001). Estudios realizados sobre la reducción del consumo de proteína, muestran que se puede incrementar la expresión de algunos transportadores de péptidos o aminoácidos (Zhang *et al.*, 2013), como una medida de incrementar la eficiencia de absorción de los mismos. Arg y Lis son absorbidos por el enterocito, con una alta afinidad, por transportadores $b^{0,+}$ independientes de Na (Majumder *et al.*, 2009). El sistema $b^{0,+}$ es el transportador más importante para AA catiónicos en células epiteliales (Palacin *et al.*, 2001). El sistema $b^{0,+}$ intercambia Leu por Lis (Torras-Llort *et al.*, 2001), indicando que la absorción intestinal de Lis es acoplada con el flujo de salida de Leu.

Debido a que los AA unidos a proteína deben ser liberados por enzimas pancreáticas e intestinales antes de su absorción, los AA libres pueden ser absorbidos rápidamente y su disponibilidad para la síntesis de proteína podría ser

más alta (Rerat *et al.*, 1992). Hatzoglou *et al.*, (2004), realizaron estudios *in vitro*, encontrando que la expresión de transportadores de AA catiónicos se reguló por el contenido de estos AA. Asumiendo que la expresión de los transportadores de AA representa plenamente su actividad (Dave *et al.*, 2004; Hatzoglou *et al.*, 2004). La concentración de AA libres en el contenido intestinal y el fluido extracelular de hígado y músculo puede afectar la absorción y la entrada celular de AA en cerdos, que a su vez puede afectar su disponibilidad y el rendimiento de los cerdos. Estudios recientes indican que el nivel de AA en dietas típicas para cerdos afecta la expresión de sus transportadores específicos a nivel celular (García-Villalobos *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2013). Debido a que los AA en proteínas intactas de la dieta están disponibles para absorción en intestino delgado tiempo después de que los AA libres ingresan al torrente sanguíneo, se especula que la abundancia de sus transportadores es diferente cuando se incorporan en forma libre.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Proteína intacta en alimento como parte de la nutrición animal

La calidad de la proteína en la dieta de los cerdos es un reflejo de la cantidad y la disponibilidad de AA esenciales. La formulación de dietas bajo el concepto de proteína ideal ha sido propuesta por más de 50 años por Mitchell (1964)., y actualmente sigue siendo muy relevante. Esta situación se refiere a que todos los AA esenciales son dependientes para el rendimiento de los cerdos de modo que el suministro de AA coincida exactamente con el requerimiento de estos. Los requerimientos para AA en proteína ideal se expresan normalmente en relación con el requerimiento de Lis (ejemplo Lis=100%). Si los requerimientos para otros AA son determinados para el requerimiento de síntesis de proteínas, los requerimientos para estos AA deben ser relativamente constantes (relación con Lis). Esto puede disminuir en gran medida la práctica de nutrición en el cerdo porque es necesario tener el conocimiento del cambio del requerimiento de Lis y combinarlo con el concepto de proteína ideal. El concepto de proteína ideal fue puesto en práctica por primera vez para los cerdos por ARC (ARC,1981) y desde entonces se ha utilizado tomando en cuenta los requerimientos de AA.

Los animales requieren dietas que contengan un nivel de proteína adecuado para su óptimo crecimiento. Con la finalidad de reducir la excreción de nitrógeno en la materia fecal, se ha planteado la reducción de contenido de proteína en dietas para cerdos y complementadas con AA libres para cubrir los requerimientos de los AA limitantes (NRC, 2012). Debido a que los AA unidos a proteína deben ser liberados por enzimas pancreáticas e intestinales antes de su absorción, los AA libres pueden ser absorbidos rápidamente y su disponibilidad para la síntesis de proteína podría ser más alta (Rerat *et al.*, 1992). Katz *et al.*, (1973) alimentaron cerdos en crecimiento con dietas maíz-pasta de soya con 16% de PC, es decir 3 unidades porcentuales debajo de su requerimiento de proteína, y observaron una menor ganancia de peso comparado con los cerdos alimentados con dietas con los mismos ingredientes, pero con un 19% de PC. Esto indica la necesidad de ofrecer a los cerdos la cantidad de proteína que requieren. Por otra parte, es importante tomar

en cuenta los ingredientes de las dietas para evitar un comportamiento productivo bajo, ya que en animales que fueron alimentados con dietas sorgo-pasta de soya tuvieron un comportamiento productivo diferente a los que fueron alimentados con dietas maíz-pasta de soya (Trujillo-Coutiño *et al.*, 2007). En ese caso, debido a que el perfil de AA de ambos granos es diferentes, se estima que los animales que recibieron la dieta con sorgo, emplearon menos eficientemente los AA de la dieta y el sorgo contiene otros factores antinutricionales (Taninos) que no están presentes en el maíz e interfieren con la digestión y la absorción de la proteína (De Blas *et al.*, 1999). Otro efecto que se observó en la suplementación de Lis en dietas para cerdos alimentados una vez al día en lugar de 6 veces al día se redujo la ganancia en la canal, la conversión alimenticia y disminuyó la excreción de N (Batterham y Murison, 1981). Debido a que por lo general se permite a los cerdos acceso *ad libitum* al alimento, no puede ser un problema práctico en la utilización ineficiente de AA cristalinos. Sin embargo, todavía podría ser un problema en situaciones en las que los cerdos son alimentados una vez al día, como en cerdas gestantes o cerdos de alimentación restringida utilizados en muchos estudios de investigación.

2.2 Importancia de los aminoácidos funcionales para la alimentación de cerdos

Los AA son definidos como sustancias orgánicas que contienen tanto grupo amino y ácido. De acuerdo con las necesidades en la dieta, los AA fueron tradicionalmente clasificados como esenciales y no esenciales tanto para seres humanos como para animales. Los AA esenciales son aquellos que no pueden ser sintetizados o aquellos que son inadecuadamente sintetizados *de novo* por el cuerpo en relación con las necesidades y que deben proporcionarse a partir de la dieta para cubrir los requerimientos óptimos. Los AA condicionalmente esenciales son sintetizados en cantidades suficientes por el organismo, pero en condiciones específicas deben proporcionarse a partir de la dieta para satisfacer las necesidades de óptimo crecimiento de los animales cuando las tasas de utilización sean mayores que las tasas de síntesis; por ejemplo, para poder tener mayor crecimiento muscular es necesario cubrir el requerimiento de Leu para que se lleve a cabo la síntesis de proteína muscular. En consecuencia, las necesidades funcionales (por ejemplo,

reproducción y prevención de enfermedades) también deben ser un criterio para la clasificación de AA en esenciales o condicionalmente esenciales. Los AA no esenciales son los que se pueden sintetizar de *novo* en cantidades adecuadas por el organismo para satisfacer los requerimientos del mismo (Wu G. 2009; Bergen W. G. y Wu G. 2009). Es importante tomar en cuenta que los 20 AA forman parte fundamental de la estructura de todas las proteínas y sus metabolitos son requeridos para fisiología y función celular normales (El Idrissi 2008; Lupi *et al.*, 2008; Novelli y Tasker 2008; Phang *et al.*, 2008).

El metabolismo anormal de un AA interrumpe la homeostasis del organismo, perjudicando el crecimiento y desarrollo, e incluso puede causar la muerte (Orlando *et al.*, 2008; Willis *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2004c). Se ha demostrado que además de su papel como bloques de construcción de proteínas y polipéptidos, algunos AA son reguladores importantes de vías metabólicas necesarias para el mantenimiento, crecimiento, reproducción e inmunidad de los organismos, mejorando así la eficiencia de la utilización de los alimentos, reduciendo la acumulación de adipocitos y mejorando la salud animal (Suenaga *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2007a, b, c). Estos son llamados AA funcionales, e incluyen Arg, Cis, Glu, Leu, Pro y Trp.

2.2.1 Arginina como AA funcional

Arg es un AA esencial y también reconocido como funcional por su participación en diversos procesos celulares, más allá de la síntesis de proteína. Además de ser el centro del mecanismo regulador de la eliminación de residuos nitrogenados a través de la urea, Arg es el precursor nitrogenado en la síntesis del óxido nítrico (ON) y la síntesis de poliaminas (putresina, espermina y spermidina), creatina y creatinina (Jobgen *et al.*, 2006). La enzima arginasa (I y II) cataliza la conversión de Arg en urea y ornitina; esta última es el principal precursor de las poliaminas. En contraste, la enzima ON sintetasa (ONS), con el cofactor tetrahydro-biopterin (BH4), convierte Arg en ON y citrulina (Windhal *et al.*, 2008). El ON y las poliaminas intervienen directamente en funciones relacionadas con la circulación sanguínea y protección del epitelio intestinal del animal. Se ha documentado que alrededor del 40% de la Arg consumida en la dieta por cerdos y humanos adultos no llega a circulación

sistémica porque es metabolizada en el intestino delgado para la síntesis de poliaminas principalmente (Wu *et al.*, 2007a).

2.2.2 Leucina como AA funcional

Leucina, es un AA esencial de cadena ramificada, que puede ser sintetizado de *novo* en humanos y otros mamíferos (Hutson, 2006). Actualmente se reconoce que Leu no solo juega un papel como sustrato para la síntesis de proteína, si no también actúa como una señal de nutrientes para regular la síntesis de proteínas en varios tejidos del cuerpo, incluyendo musculo esquelético (Anthony *et al.*, 2001).

2.2.3 Isoleucina y valina como AA funcional

La isoleucina es un AA limitante después de Val y su nivel dietético podría determinar el nivel de proteína en la dieta mediante una fórmula que se utilice en una gama completa de piensos de AA disponibles. Por lo tanto, es necesario considerar este AA en la formulación de raciones teniendo el nivel adecuado que requerimientos. Valina es el quinto AA limitante después de triptófano en dietas para lechones. La Val es un AA indispensable para el crecimiento y la acumulación de proteínas en el organismo, una deficiencia de valina en la dieta puede afectar la utilización de otros AA limitantes y, por lo tanto, el crecimiento de los animales. Val pertenece al grupo de AA de cadena ramificada, junto con leucina e isoleucina. Debido a su vía catabólica común existen algunas interacciones entre ellos. Por lo que es -necesario tomar en cuenta su requerimiento y asegurar que el alimento suministra un perfil adecuado de AA (Gloaguen M. *et al.*, 2011; Gloaguen M. *et al.*, 2012).

2.3 Composición de la canal de cerdos

La genética (Tess *et al.*, 1986; Gu *et al.*, 1992), el sexo, la nutrición (Davey y Bereskin, 1978), el ambiente (Stahly y Cromwell, 1979), y sus interacciones juegan un papel importante en la composición de la canal de los cerdos. Modelos matemáticos utilizados en cerdos en crecimiento pueden desarrollarse datos que cuantifican la acumulación de tasas que determinan la acumulación de proteína, lípidos, humedad y ceniza en el cuerpo. La acumulación de tejido magro y de tejido

graso es de interés primordial por que la cantidad y proporción de estos dos componentes determinan- el valor económico de la canal (Akridge *et al.*, 1992). Los cambios en la composición de músculo y grasa durante el crecimiento son necesarios para entender los cambios del perfil nutricional -del animal (Wagner J. R. *et al.*, 1999).

Debido a que los órganos viscerales del organismo contribuyen a la eficiencia de la conversión de nutrientes en la dieta de cerdos (De Lange *et al.*, 2001), se debe considerar cuidadosamente las necesidades de nutrientes de los órganos viscerales en el cerdo. Los componentes químicos principales en el son: agua, proteína, lípidos, y ceniza; además, el organismo del cerdo contiene pequeñas cantidades de carbohidratos (glucógeno en hígado y músculo, Cuadro 1)

Cuadro 1. Composición química (%) del cerdo en diferentes pesos

Componente	Nacimiento	7 kg de PV	25kg de PV	Peso de mercado (aprox. 110 kg de PV)	
				Tejido adiposo	Tejido Muscular
Agua	77	66	69	48	64
Proteína	18	16	16	14	18
Lípidos	2	15	12	35	15
Cenizas	3	3	3	3	3

Derivado de McMeekan (1940); Richmond y Berg (1971a,b); de Greef *et al.*, (1994); Whittemore (1993); Bikker *et al.*, (1995; 1996a,b); Coudenys (1998).

La calidad de la canal del cerdo puede ser definida como la combinación de diversas propiedades de carne fresca. Estas propiedades incluyen la aceptación del consumidor y aspectos tecnológicos, color, capacidad de retención de agua, y textura; todos estos factores son afectados por procesos bioquímicos. Los mecanismos que controlan la calidad de la carne de cerdo se asocian con alteraciones postmortem en el metabolismo muscular. Específicamente, los cambios

en la extensión o la tasa de glucólisis pueden crear un pH ácido, que es desfavorable en músculo. El pH final bajo resulta en la desnaturalización de proteínas musculares y menores parámetros de calidad (Hammelman *et al.*, 2003; Henckel, Karlsson, Oksbjerg, y Petersen, 2000).

2.4 Actividad enzimática pancreática en cerdos

Las enzimas son constituidas por proteínas y otras sustancias semejantes a las vitaminas y minerales, que hacen posible diferentes reacciones químicas de los procesos metabólicos, (anabólicos y catabólicos de la digestión y metabolismo animal, Quintero, M. A. 1995). La presencia y el mantenimiento de un conjunto completo y equilibrado de enzimas que son esenciales para la desintegración de nutrientes a fin de que proporcionen energía (Kennelly y Rodwell. 2009)

Las enzimas usan diversas combinaciones de cuatro mecanismos generales para lograr un notorio aumento catalítico.

a. Catálisis por proximidad

Para que las moléculas reaccionen, deben acercarse hasta ubicarse dentro de la distancia formadora de enlace de otra. Mientras más alta sea su concentración, con mayor frecuencia se encontrarán una con otra y mayor será el índice de su reacción. Cuando una enzima se une a moléculas de sustrato en su sitio activo, crea una región de concentración local alta de sustrato. Este ambiente también orienta las moléculas de sustrato de manera espacial en una posición ideal para que interactúen, lo que origina aumentos del índice de al menos mil veces. (Kennelly y Rodwell. 2009)

b. Catálisis ácido básica

Los grupos funcionales ionizables de cadenas laterales aminoácido y de grupos prostéticos, contribuyen a la catálisis al interactuar como ácidos o bases. La catálisis acidobásica puede ser específica o general; por “específica” se alude a protones (H_3O^+) o iones OH^- . En la catálisis específica para ácido o específica para base, el índice de reacción es sensible cambios de la concentración de protones, pero

independientemente las concentraciones de otros ácidos o bases presentes en solución o en el sitio activo. (Kennelly y Rodwell. 2009)

c. Catálisis por tensión

Las enzimas que catalizan reacciones *–líticas* que comprenden la rotura de un enlace covalente típicamente se unen a sus sustratos en una conformación muy desfavorable para el enlace que sufrirá la división. Tal conformación imita la del intermediario de estado de transición, especie transitoria que representa la transición o el punto medio en la transformación de sustratos en productos. La tensión resultante estira o deforma el enlace al cual se dirige, esto lo debilita y lo hace más vulnerable a división. (Kennelly y Rodwell. 2009)

d. Catálisis covalente

El proceso de catálisis covalente comprende la formación de un enlace covalente entre la enzima y uno o más sustratos. La enzima modificada después se convierte en un reactivo. La catálisis covalente introduce una nueva vía de reacción cuya energía de activación es más baja–y, por ende, es más rápida–que la vía de reacción en la solución homogénea. La catálisis covalente se observa con particular frecuencia entre enzimas que catalizan reacciones de transferencia de grupo. Los residuos sobre la enzima que participa en la catálisis covalente por lo general son cisteína o Serina y, en ocasiones, histidina. La catálisis covalente a menudo sigue un mecanismo en donde el primer sustrato es unido y su producto se libera antes de la unión del segundo sustrato (Kennelly y Rodwell. 2009).

Existen diferentes enzimas que son secretadas en el lumen intestinal (por ejemplo: tripsina, quimotripsina, (Scheele, et al., 1981; Whitcomb, D. C. y Lowe, M. E. 2007) Algunas enzimas están presentes en diferentes formas, por ejemplo, tripsinógeno catiónico, tripsinógeno anicónico y mesotripsinógeno). Además, son capaces de digerir las células y causar un daño significativo. Existen diferentes mecanismos para evitar que estas enzimas digieran potencialmente el páncreas, incluyendo el almacenamiento y el empaquetamiento de gránulos de zimógeno ácidos para inhibir su actividad; síntesis y almacenamiento como formas precursoras inactivas.

Algunas proenzimas como tripsinógenos y quimotripsinógenos se activan cuando entran en duodeno como se muestra en la Figura 1, la activación de estas enzimas tiene lugar en la superficie de la luz duodenal, donde una glucoproteína péptidasa que se encuentra el borde intestinal, la enteroquinasa activa el tripsinógeno eliminando (por hidrólisis) un fragmento hexapeptídico N-terminal de la molécula (Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lis, (Beck, I. T. 1973; Rinderknecht, H.; 1986). Una vez que está activa a tripsina, cataliza la activación de otras proenzimas inactivas. Es importante mencionar que muchas enzimas digestivas clave, como la amilasa y lipasa, están presentes en el páncreas de forma activa. Estas enzimas no causan daño pancreático celular alguno si se liberaran en tejido pancreático, ya que no tienen el almidón como sustrato disponible en tejido pancreático.

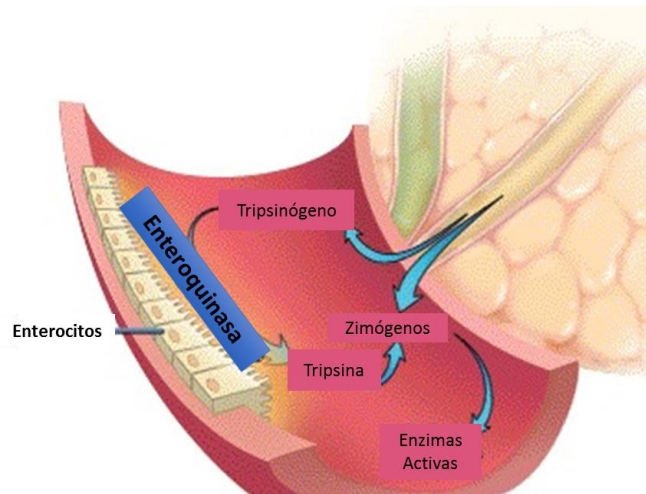


Figura 1. Activación de enzimas digestivas intestinales. Las proenzimas inactivas llamadas zimógenos entran en el duodeno donde la enteroquinasa que está unida a la superficie intestinal del enterocito se une con el zimógeno y activa tripsina. La tripsina, a su vez, convierte los zimógenos incluyendo el propio tripsinógeno a su forma enzimática activa mediante ruptura enzimática. Pandol S. J. The Exocrine Pancreas. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Digestive Enzymes. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54127>

La catálisis de proteasas aspárticas involucra el ataque hidrolítico directo de agua sobre un enlace peptídico, la catálisis por la Serina proteasa quimotripsina comprende la formación previa de un intermediario de enzima acilo covalente. Un residuo serilo muy reactivo, la Serina 195, participa en una red de transmisión de carga con histidina 57 y aspartato 102. Muy separados en su estructura primaria, en el sitio activo estos residuos están dentro de la distancia formadora de enlace de otro. Alineados en el orden Asp 102His 57Ser 195, constituyen una “red de transmisión de carga” que funciona como un “transbordador de protón” La unión de sustrato inicia desviaciones de protón que, en efecto, transfieren el protón hidroxilo de Ser 195 a Asp 102. La nucleofilicidad aumentada del oxígeno serilo facilita su ataque sobre el carbono carbonilo del enlace peptídico del sustrato, lo que forma un intermediario de aciloenzima covalente. El protón en Asp 102 a continuación se transborda a través de His 57 hacia el grupo amino que es liberado cuando el enlace peptídico se divide. La porción del péptido original con un grupo amino libre después deja el sitio activo y es remplazada por una molécula de agua. La red de transmisión de carga ahora activa la molécula de agua al extraer un protón a través de His 57 hacia Asp 102. El ion hidroxilo resultante ataca el intermediario aciloenzima y un transbordador de protón inverso regresa un protón a Ser 195, lo que restituye su estado original. Si bien se modifica durante el proceso de catálisis, la quimotripsina surge sin cambios en el momento en que se completa la reacción. La tripsina y la elastasa emplean un mecanismo catalítico similar, pero los números de los residuos en sus transbordadores de protón SerHisAsp difieren (Kennelly y Rodwell. 2009).

La actividad de la enzima puede ser afectada por el pH y la temperatura, además cada enzima es específica, realiza una sola reacción, lo que debe ser tomado en cuenta cuando se selecciona una enzima para añadirla a la ración del animal (Wek, C. 1992). Según Jorgensen y Just 1988 y Sutton et al., 1992. La acción de las enzimas endógenas en el tracto gastrointestinal es básicamente a nivel del intestino delgado. A pesar de la gran producción de enzimas a nivel de boca y estómago, la degradación de los nutrientes no es tan importante debido al corto tiempo que permanece la enzima con el sustrato, además el bajo pH estomacal influye de una manera directa inhibiendo la actividad enzimática (Jorgensen, H. and Just, A. 1988;

Sutton et al., 1992). El lugar de actividad de las enzimas exógenas coincide con las endógenas, por lo tanto, la suplementación enzimática es más activa en la parte anterior del intestino delgado; consecuentemente, ellas tienden a sobrevivir a los bajos valores de pH del estómago donde la degradación microbial de nutrientes no pueden ser realizada a (Jorgensen, H. and Just, A. 1988; Sutton et al., 1992)

El punto principal de absorción de nutrientes se realiza en el intestino delgado de todos los organismos. Estudios realizados con ratas indican que el tipo y el nivel del sustrato en la dieta influye negativamente en la secreción de enzimas pancreáticas (Bautista N. *et al.*, 2002). Liddle et al., (1988) observó que la proteína, la grasa o los carbohidratos estimulan la secreción de la colecistoquinina, y no los AA libres, esta hormona es responsable de la secreción del jugo pancreático en el tubo digestivo. Recientemente, Hara et al., (2000) concluyeron que la actividad de las proteasas pancreáticas se incrementa al aumentar el nivel de PC en la dieta. En un estudio realizado con cerdos, Hee et al., (1988) encontraron que la actividad de tripsina y quimotripsina fue considerablemente más baja cuando los animales consumieron dietas libres de proteína que al recibir otra dieta con 15% de PC.

Las dietas bajas en proteína resultan en una disminución en la ingesta de AA y nitrógeno (Portejoie *et al.*, 2004), limitando así la síntesis de novo de AA y disminuyendo la función digestiva (Orlando *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2014c). El tracto digestivo es responsable de la digestión y absorción de nutrientes, incluida la proteína (Wu G. 2013a). La digestión es un proceso de transformaciones metabólicas complejas, que requiere energía y AA, y es regulada por hormonas y otros factores (Navarro-Guillen *et al.*, 2015; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009). Para extraer eficientemente los nutrientes de los alimentos ingeridos, se requiere un repertorio complejo de enzimas digestivas que descomponen los macronutrientes de la dieta para facilitar su absorción (Kaji *et al.*, 2013). Se sabe que las enzimas proteolíticas son producidas principalmente por el estómago (pepsina), el páncreas (tripsina, quimotripsina y elastasa) en el intestino (enzimas membranosas y citosólicas) (Infante y Cahu, 2007)

2.5 Absorción intestinal y transporte de aminoácidos

La absorción de nutrientes desde el lumen del intestino comienza con su transporte, tanto activo o pasivo, a través de la membrana de las células epiteliales que recubren la superficie de la mucosa. Esto continúa a través de las células o por el ingreso al sistema linfático (Graham L., 1980). La absorción y transporte de aminoácidos es un proceso fisiológico complejo influenciado por muchos factores (He *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013) incluyendo el nivel de proteína en la dieta y el balance de aminoácidos. Wu *et al.* (2015) reportaron que una excesiva reducción del nivel de la proteína en la dieta con la adición de aminoácidos resultó en una reducción importante en la expresión de los genes que codifican para proteínas transportadoras de aminoácidos en yeyuno. Mientras que Morales *et al.* (2015) encontraron un incremento en la expresión de los transportadores de aminoácidos cuando se redujo el nivel de proteína en la dieta acoplado con la adición de aminoácidos (AA). Liao *et al.* (2009) concluyeron que el aumento en el suministro luminal de AA redujo la capacidad de transporte por la membrana apical y basolateral. El transporte de aminoácidos libres a través de la membrana apical o basolateral depende de las proteínas de transporte y de la actividad de las mismas (Liao *et al.*, 2009).

Existen diferentes sistemas o mecanismos de transporte de AA hacia el torrente sanguíneo. El sistema rBAT/b^{0,+}AT (SLC3A1/SLC7A9) es el principal transportador de aminoácidos catiónicos y neutros, en la membrana apical de riñón e intestino (Palacin *et al.*, 2001). Este sistema consiste en dos subunidades de proteína, la primera es la cadena ligera b^{0,+}AT (Figura 2), que es una proteína transmembrana de 487 aminoácidos (masa molecular 50 kDa) y 12 α -hélices transmembrana, siendo ésta la unidad activa del sistema; la segunda es la proteína rBAT, que es conocida como la cadena pesada por su mayor masa molecular, compuesta de 685 aminoácidos y altamente glucosilada (Tate *et al.*, 1992; Wells *et al.*, 1992; Bertran *et al.*, 1993). Ambas subunidades se expresan en la superficie de la membrana, siendo b^{0,+}AT quien estabiliza a la subunidad mayor y promueve el tráfico a la membrana apical desde el retículo endoplásmico (Baunch *et al.*, 2003).

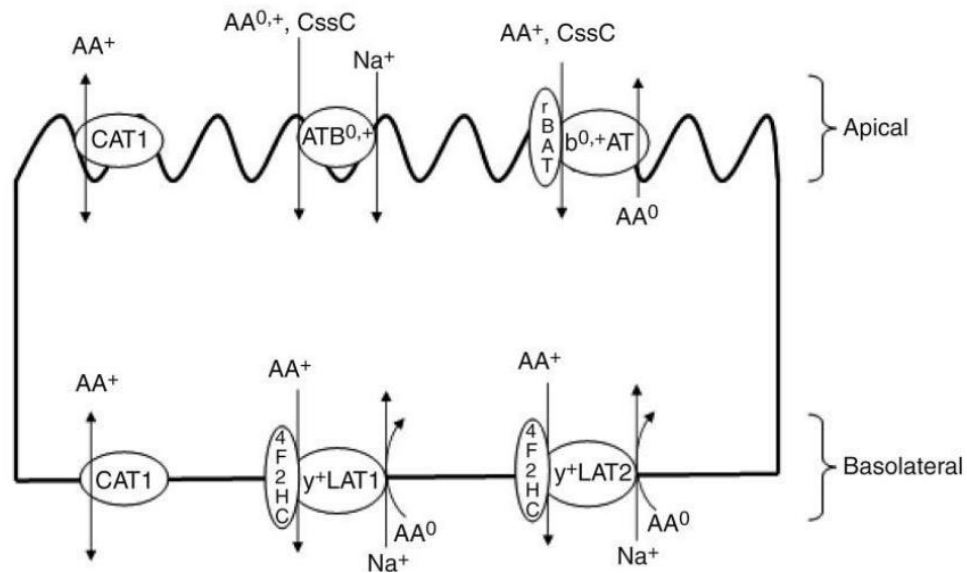


Figura 2. Modelo hipotético de mamífero asociado a proteínas transportadoras de AA catiónicos en células epiteliales de intestino delgado. La localización subcelular y la dirección predominante del flujo del sustrato se representa para cada unidad de transporte AA+= AA catiónico; AA_{0,+}= AA catiónico y neutral; CysC= Cistina (Liao et al., 2009)

Otro transportador es y⁺LAT1/4F2HC (Figura 2), éste es un mediador de flujo de salida de aminoácidos catiónicos a partir de células epiteliales (Bröer, 2008). La cadena ligera 4F2HC está vinculado a varias funciones de transporte: 4F2HC/LAT1 y 4F2HC/LAT2, son dos variantes del sistema de transporte de L (un transportador de aminoácidos neutros grandes, p. ej., leucina). Ambas isoformas llevan a cabo el intercambio de aminoácidos neutros Leu, Iso, Pro, Val, Gli, Met, Fen y Trp. Los transportadores de aminoácidos heteroméricos incluyen 4F2HC/y⁺LAT1 y 4F2HC/y⁺LAT2 (SLC3A2/SLC7A6 y SLC3A2/SLC7A7) que corresponden al sistema de transporte de aminoácidos y⁺L, este transportador regula el flujo de salida de un

aminoácido di básico, a cambio de un aminoácido neutro extracelular más Na⁺, con una Km aparente de ~20 M (Torrents *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 1999; Kanai *et al.*, 2000). Se especula que el ion Na⁺ reemplaza la carga positiva de la cadena lateral de aminoácidos di básicos cuando se transportan aminoácidos neutros.

El sistema molecular B⁰ (Figura 2), es el principal transportador de aminoácidos neutros en riñón y en intestino delgado, B⁰AT1 (SLC6A19; Bröer, 2004), constituido por una proteína de 634 aminoácidos. De acuerdo con estudios en intestino (Preston *et al.*, 1974), la Vmax parecen ser bastante similar, pero su afinidad es diferente para cada aminoácido. El transportador demuestra cierta afinidad por lisina e interactúa con los aminoácidos catiónicos a un pH bajo (Schultz S.G y Curran P.F., 1970). La afinidad de sustrato aumenta en condiciones de hiperpolarización (Bröer *et al.*, 2008). Este transportador se expresa en el túbulo contorneado proximal del riñón (Bröer *et al.*, 2004, Romeo *et al.*, 2006) y en el intestino delgado, con incremento en su expresión desde el duodeno hasta el íleon (Romeo *et al.*, 2006; Terada *et al.*, 2005). El transportador se limita a la membrana apical de las vellosidades, y es consistente en los enterocitos diferenciados (Bröer *et al.*, 2004). Además de riñón e intestino, este transportador se expresa en bazo y pulmón (Bröer *et al.*, 2008).

3. CAPITULO 1

3.1 Dietas bajas en proteína suplementadas con aminoácidos para cerdos en crecimiento: efecto en la expresión de transportadores de aminoácidos, concentración sérica, desarrollo y composición de la canal.

ABSTRACT

Pigs fed protein-bound AA appear to have a higher abundance of AA transporters for their absorption in the jejunum compared with the duodenum. However, there is limited data about the effect of dietary free AA, readily available in the duodenum, on the duodenal abundance of AA transporters and its impact on pig performance. Forty-eight pigs (24.3 kg initial BW) distributed in 4 treatments were used to evaluate the effect of the CP level and form (free vs. protein bound) in which AA are added to diets on the expression of AA transporters in the 3 small intestine segments, serum concentration of AA, and performance. Dietary treatments based on wheat and soybean meal (SBM) were 1) low-CP (14%) diet supplemented with L-Lys, L-Thr, DL-Met, L-Leu, L-Ile, L-Val, L-His, L-Trp, and L-Phe (LPAA); 2) as in the LPAA but with added L-Gly as a N source (LPAA+N); 3) intermediate CP content (16%) supplemented with L-Lys HCl, L-Thr, and DL-Met (MPAA); and 4) high-CP (22%) diet (HP) without free AA. At the end of the experiment, 8 pigs from LPAA and HP were sacrificed to collect intestinal mucosa and blood samples and to dissect the carcasses. There were no differences in ADG, ADFI, G:F, and weights of carcass components and some visceral organs between treatments. Weights of the large intestine and kidney were higher in HP pigs ($P < 0.01$). Expression of $b^{0,+}$ in the duodenum was higher in pigs fed the LPAA compared with the HP diet ($P = 0.036$) but there was no difference in the jejunum and ileum. In the ileum, $y+L$ expression tended to be higher in pigs fed the LPAA diet ($P = 0.098$). Expression of $b^{0,+}$ in LPAA pigs did not differ between the duodenum and the jejunum, but in HP pigs, the expression of all AA transporters was higher in the jejunum than in the duodenum or ileum ($P < 0.05$). The serum concentration of Arg, His, Ile, Leu, Phe, and Val was higher but serum Lys and Met were lower in pigs fed the HP diet ($P < 0.05$). These results indicate that LPAA can substitute up to 8 percentage units of protein in HP wheat–SBM diets without affecting pig performance; nonessential N does not seem

to be limiting in very low-protein wheat–SBM diets for growing pigs. Also, the inclusion of free AA in the diet appears to affect their serum concentration and the expression of the AA transporter b^{0,+} in the duodenum of pigs.

Key words: amino acid transporter, free amino acids, pigs, serum amino acids

RESUMEN

Los cerdos alimentados con aminoácidos (AA) unidos a proteína parecen tener una mayor abundancia de transportadores de AA para su absorción en yeyuno comparado con duodeno. Sin embargo, estos datos son limitados sobre el efecto dietético de AA libres, realmente disponibles en duodeno, sobre la abundancia duodenal de transportadores de AA y su impacto en el desarrollo de cerdos. 48 cerdos (24.3 kg Peso vivo) distribuidos en 4 tratamientos fueron usados para evaluar el efecto del nivel de PC y de (Libre vs. Unido a proteína) en el que se adicionan AA a las dietas sobre la expresión de transportadores de AA en los 3 segmentos de intestino, concentración sérica de AA, y desarrollo. Los tratamientos dietéticos a base de trigo y pasta de soya (PS) fueron 1) Bajo-PC (14%) dieta suplementada con L-Lis, L-Tre, DL- Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L- Fen (BPAA); 2) como la dieta BPAA pero adicionando L-Gli como fuente de N (BPAA+N); 3) Contenido medio de proteína (16%) suplementado con L-Lis HCL, L-Tre y DL-Met (MPAA); y 4) Alto contenido de proteína AP (22%) sin AA libres. Al final del experimento, 8 cerdos de BPAA y AP fueron sacrificados para colectar muestras de mucosa intestinal y muestras sanguíneas además de la disección de la canal. No hubo diferencia en GDP, EFA, G: E y en pesos de los componentes de la canal del mismo modo en órganos viscerales entre tratamientos. Los pesos del intestino grueso y riñón fueron mayores en los cerdos de la dieta AP ($P < 0.01$). La expresión de $b^{0,+}$ en el duodeno fue mayor en los cerdos alimentados en la dieta BPAA comparado con la dieta AP ($p = 0.036$) pero no hubo diferencias en yeyuno e íleon. En íleon, la expresión de y^+L tendió a ser mayor en cerdos alimentados con la dieta BPAA ($p = 0.098$). La expresión de $b^{0,+}$ en los cerdos alimentados con la dieta BPAA o fue diferente entre duodeno y el yeyuno, pero en los cerdos de la dieta AP, la expresión de todos los transportadores de AA fue mayor en el yeyuno que en el duodeno o íleon ($p > 0.05$). La concentración sérica de Arg, His, Iso, Leu, Fen, y Val fue mayor pero en Lis y Met fue menor en cerdos alimentados con la dieta AP ($P < 0.05$). Estos resultados indican que la dieta BPAA puede sustituirse con 8% de unidades de proteína en AP de dietas trigo-pasta de soya sin afectar el desarrollo del cerdo; N no es esencial, no parece ser limitante de muy bajo contenido de proteína en dietas

trigo pasta de soya para cerdos en crecimiento. Además, la inclusión de AA libres en la dieta parece afectar a su concentración en suero y la expresión del transportador de AA b^{0,+} en duodeno de cerdos.

3.2 INTRODUCCIÓN

La alimentación de cerdos con dietas bajas en proteína suplementadas con AA libres se ha convertido en una práctica común debido a su mejor perfil de AA y reducción de la excreción de N (Carter et al., 1996). Estas dietas con AA libres contienen AA disponibles para su absorción en el duodeno y AA unidos a proteína que necesitan ser digeridos antes de su absorción. Las dietas bajas en proteína contienen altos niveles de Lis libre pero no AA neutros libres. Lisina es absorbida por el transportador de AA $b^{0,+}$ (Majumder et al., 2009) y y^{+L} (Bröer, 2008) en el intercambio por AA neutros, especialmente Leu. El sistema B^0 es el mayor transportador de AA neutros (Broer et al., 2004). Se espera una mayor abundancia de estos transportadores en yeyuno de los cerdos alimentados con AA unidos a proteína, pero estos datos no están disponibles, ni tampoco se conoce como es la expresión de los transportadores de AA en duodeno de los cerdos alimentados con AA libres o unidos a proteína.

Se ha observado menor comportamiento productivo y alto contenido en grasa en la canal de los cerdos cuando el nivel de PC en las dietas se reduce en 4 o más unidades porcentuales, lo que provoca que uno o más AA se conviertan en limitantes (Tuitoek et al., 1997; Yue y Quiao, 2008). El sistema de energía (EM vs. EN) usado para la formulación de dietas (Noblet et al., 1994), energía (Kerr et al. 2003) y el contenido de N no esencial (Kendall et al., 2004), así como el perfil de AA, pueden ser responsables de un bajo desempeño. Actualmente, están disponibles cinco AA esenciales en que pueden suplementarse en forma libre, lo cual facilitan el mejoramiento del perfil de AA en la dieta, pero también puede disminuir, a niveles limitantes, el contenido del N total y AA no esencial en la dieta. Nuestra hipótesis fue que los AA libres estimulan la expresión de transportadores de AA en duodeno, afectando la absorción y concentración sérica de AA, y que no será afectado el comportamiento productivo y la composición corporal de los cerdos alimentados *ad libitum* con una dieta baja en proteína suplementada con AA o con dieta alta en proteína (AP), siempre que estas sean formuladas con un contenido similar EN y bajo el concepto de proteína ideal. En este estudio se analizó la expresión de transportadores de AA, el rendimiento y composición de la canal de

cerdos alimentados con una dieta baja en PC y suplementada con AA libres o una dieta AP sin la suplementación de AA libres.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Animales, instalaciones y tratamientos dietéticos

Los cerdos utilizados en este experimento fueron cuidados de acuerdo a las guías establecidas en la Norma oficial mexicana de regulaciones sobre el cuidado animal (Ochoa, 2001). Se utilizaron 48 cerdos cruzados (Large White X Duroc) con un peso inicial de 24.3 ± 1.0 kg, el experimento tuvo una duración de 21-d. Los cerdos fueron aleatorizados en 4 tratamientos, 12 réplicas (5 Machos castrados y 7 hembras) por tratamiento. El peso inicial de los cerdos fue balanceado de acuerdo a los tratamientos. Los cerdos fueron alojados de forma individual en jaulas metabólicas de piso elevado (1.2 m ancho, 1.2 m largo y 1.0 m alto) equipado con un bebedero de chupón y piso de acero a una temperatura controlada (22-24°C). Todos los cerdos tuvieron el agua y el alimento se suministró *ad libitum*. Los cerdos se pesaron cada semana, con la misma frecuencia se pesó el rechazo de alimento de los comederos. La GDP, CDA y G: C fueron calculados de forma semanal. El promedio de PV al final del experimento fue de 39.8 ± 1.3 kg.

Los cerdos fueron aleatorizados a 1 de 4 dietas (Cuadro 2) basadas en trigo y pasta de soya como sigue: 1) Bajo en PC (14%) dieta suplementada con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L- Fen (BPAA); 2) como la dieta BPAA pero adicionando L-Gli como fuente de N (BPAA+N); 3) intermedio contenido de proteína (16%) suplementado con L-Lis HCL, L-Tre y DL-Met (MPAA); y 4) Alto contenido de proteína AP (22%) sin AA libres. La dieta AP fue formulada para reunir los requerimientos de DIE de Lis para cerdos con un promedio de 25 a 50 kg (NRC, 2012). Las dietas MPAA y BPAA fueron formuladas para una relación óptima para los primeros 3 y 9 AA limitantes, respectivamente.

Cuadro 2. Composición de dietas experimentales (Base tal como se ofrece)

Ingrediente,%	Dieta ¹			
	BPAA	BPAA+N	MPAA	AP
Trigo	91.46	90.40	81.73	64.90
Pasta de soya, 48%	4.00	4.00	13.80	30.30
L-Lis HCL	0.80	0.80	0.50	0.00
L-Tre	0.27	0.27	0.15	0.00
DL-Met	0.11	0.11	0.07	0.00
L-Trp	0.04	0.04	0.00	0.00
L-Fen	0.09	0.09	0.00	0.00
L-Leu	0.25	0.25	0.00	0.00
L-Iso	0.13	0.14	0.00	0.00
L-His	0.08	0.08	0.00	0.00
L-Val	0.7	0.17	0.02	0.00
L-Gli	0.00	1.00	0.00	0.00
Carbonato de Ca	1.40	1.40	1.28	1.25
Fosfato dicálcico	0.65	0.70	0.70	1.00
Sal ionizada	0.35	0.35	0.35	0.35
Premezcla de vit. Y min ² .	0.20	0.20	0.20	0.20
Aceite de canola	0.00	0.00	1.20	2.00
Contenido calculado				
EN, MJ/kg	10.26	10.25	10.23	10.10
PC,%	14.0	14.0	16.0	22.0
DIE ³ Arg,%	0.59	0.58	0.85	1.30
DIE His,%	0.4	0.34	0.35	0.50
DIE Iso,%	0.52	0.53	0.54	0.80
DIE Leu,%	0.99	0.99	0.99	1.39
DIE Lis,%	0.98	0.98	0.98	0.98
DIE Met,%	0.28	0.28	0.28	0.28
DIE Fen,%	0.55	0.54	0.58	0.63
DIE Tre,%	0.59	0.59	0.61	0.68
DIE Trp, %	0.18	0.17	0.18	0.25
DIE Val,%	0.64	0.64	0.64	0.88

¹BPAA= PC-Bajo (14%) suplementación de la dieta con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen; BPAA+N= como I BPAA pero se adiciono L-Gli

como fuente de N; MPAA= contenido intermedio de PC (16%) suplementada con L-Lis HCL, L-Tre, y DL-Met; AP= Dieta alta en PC (22%).

²Cada kg de dieta contenía: Vitamina A, 4800 UI; vitamina D3, 800 UI; vitamina E, 4.8 UI; vitamina K3, 1.6 mg; Rivo flavina, 4 mg; D-acido pantoténico, 7.2 mg; Niacina, 16 mg; Vitamina B12, 12.8 mg; Zn, 64 mg; Fe, 64 mg; Cu, 4mg; Mn, 4 mg; I, 0.36 mg; Se, 0.13 mg.

³DIS= Digestibilidad ileal estandarizada

Para la formulación de todas las dietas se utilizó el análisis de contenido de AA (Cuadro 3) y los coeficientes de DIE para trigo y pasta de soya (Stein *et al.*, 2001); la DIE de los AA libres fue considerada 100%. El contenido de pasta de soya en las dietas BPAA, MPAA y AP fue 4, 13 y 30% respectivamente. La dieta BPAA contenía aproximadamente el 35% de Lis unida a proteína y 65 % Lis libre mientras la dieta AP contenía 100% de Lis unida a proteína. Las dietas BPAA y AP se incluyeron para probar la hipótesis de que los cerdos alimentados con una dieta baja en proteína, suplementada con AA, con una dieta trigo-pasta de soya puede ser formulada muy cerca del concepto de proteína ideal (NRC, 2012; solo Arg fue ligeramente en exceso en la dieta BPAA) y se desempeñan de forma similar que aquellos que son alimentados con una dieta alta en proteína, dieta desequilibrada en AA. En la dieta MPAA se incluyeron L-Lis, HCL, L- Tre y DL-Met porque son los AA libres disponibles en el mercado. La dieta BPAA+N fue incluida para probar la hipótesis que el N no esencial o Gli en la dieta BPAA limita el rendimiento de cerdos; de acuerdo con Rees *et al.* (1992), Gli es una buena fuente de N no esencial para la síntesis de AA no esenciales. Todas las dietas fueron suplementadas con una premezcla de vitaminas y minerales para cubrir los requerimientos de cerdos en crecimiento (NRC, 2012) y contenía 10.2 MJ EN/kg.

Cuadro 3. Análisis de la composición de AA de las dietas experimentales (base tal como se ofrece)

Aminoácido,%	Dieta ¹			
	BPAA	BPAA+N	MPAA	AP
Total N	2.76	2.89	3.09	3.86
AA esencial				
Arg	0.77	0.78	1.00	1.50
His	0.43	0.44	0.44	0.60
Iso	0.66	0.68	0.71	1.00
Leu	1.29	1.31	1.29	1.77
Lis	1.07	1.06	1.06	1.13
Met	0.33	0.35	0.34	0.35
Fen	0.81	0.81	0.86	1.18
Tre	0.66	0.71	0.74	0.83
Trp	0.22	0.23	0.23	0.32
Val	0.82	0.82	0.84	1.11
AA no esencial				
Ala	0.54	0.54	0.66	0.94
Asp	0.91	0.92	1.32	2.13
Cis	0.33	0.32	0.36	0.43
Glu	4.22	4.20	4.51	5.35
Gli	0.56	1.61	0.69	0.95
Pro	1.42	1.39	1.43	1.63
Ser	0.72	0.71	0.83	1.15

¹BPAA= PC-Bajo (14%) suplementación de la dieta con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen; BPAA+N= como la BPAA pero se adiciono L-Gli como fuente de N; MPAA= contenido intermedio de PC (16%) suplementada con L-Lis HCL, L-Tre, y DL-Met; AP= Dieta alta en PC (22%).

3.3.2 Disección de la canal y toma de muestra sanguínea

Al final del experimento, ocho cerdos de cada uno de los tratamientos BPAA y AP fueron aleatorizados para diseccionar la canal y coleccionar las muestras de tejido. Estos cerdos fueron alimentados con sus correspondientes alimentos, el día 21 días después de 11 h de ayuno; 2.5 h después de la comida, los cerdos fueron sacrificados por aturdimiento eléctrico y desangrado. La canal fue inmediatamente eviscerada y se coleccionaron muestras (aprox. 0.5g) de raspado de mucosa de duodeno, yeyuno medio e íleon en microtubos de 2 ml para analizar la abundancia de ARNm que codifica para transportadores de AA. Todas las muestras fueron

inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -82°C hasta su análisis. El proceso total de colección no fue mayor a 8 min para maximizar la calidad de extracción de ARN.

Antes del sacrificio se tomaron muestras de sangre para analizar la concentración de AA libres en suero en estado de absorción. Las muestras de sangre (aprox. 10ml) se colectaron de la arteria carótida mediante venopunción derecha. Inmediatamente después de la colección, las muestras fueron centrifugadas a $1500 \times g$ a 4°C por 10 min para separar el suero de las células sanguíneas y almacenar a -20°C hasta su análisis.

Se registraron los pesos de estómago, intestino delgado y grueso, hígado, corazón, riñón y bazo de los cerdos. El catabolismo de exceso de AA en la dieta AP (principalmente Arg, Iso, Leu, Fen y Trp) puede afectar el peso específico de órganos (Yen, 1997). La media canal derecha de cada cerdo fue completamente diseccionada después de almacenarse a 2 y 4°C por 24 h. Se separaron y pesaron los músculos del lomo, músculo de la pierna, músculos restantes, músculo total y total de tejido graso. Además, 3 cerdos fueron sacrificados al inicio del experimento y sus canales fueron procesadas por un método similar a los que fueron sacrificados al final del experimento para determinar el promedio de ganancia de tejido magro y proteína muscular. El contenido de proteína en el musculo de todos los cerdos fue analizado (Method 984.13; AOAC, 2006). La ganancia diaria de peso de músculo y acumulación diaria fue estimada basado en el contenido inicial y final de la canal.

3.3.3 Extracción y purificación de ARN total

Muestras de mucosa intestinal mediante pulverización en nitrógeno líquido y homogenización con reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a la metodología descrita por Méndez et al (2011). El ARN purificado fue eluido con $30\mu\text{l}$ de agua destilada libre de RNasas y almacenada -82°C . La concentración total de ARN fue determinada por un espectrofotómetro (Helios β , Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA) a 260 nm, y la pureza del ARN fue evaluado mediante el uso de la relación A_{260}/A_{280} , todas las muestras estuvieron dentro de un rango de 1.8 a 2.0 (Sambrook y Rusell, 2001). La integridad del ARN total fue evaluada por

electroforesis en gel de agarosa al 1%. Todas las muestras tuvieron buena calidad de ARN con la relación 28S:18S ARNr alrededor de 2.0:1.1 (Sambrook and Russell, 2001).

3.3.4 Transcripción reversa y PCR cuantitativo

Aproximadamente 2 µg de ARN total fue tratado con 1 Unidad de desoxirribonucleasasa I (Thermo Scientific, Inc., Carlsbad, CA) y 6µl de buffer de transcripción reversa 5x en una reacción completada a 30µl de agua libre de nucleasas (Thermo Scientific, Inc.); la reacción fue realizada durante 15 minutos a temperatura ambiente y después a 70°C por 15 min para detener la reacción. La transcripción reversa fue iniciada con el RNA tratado con deoxyribonucleasa, al cual se le adiciono 1 µl de solución de desoxirobonucleotidos trifosfatados (10 µM cada uno). La reacción fue incubada por 5 min a temperatura ambiente y enfriada en hielo por 1 min. A la reacción anterior se agregaron 3µl de agua libre de nucleasas, 1µl de inhibidor de ribonucleasas (40 unidades/µl; Ribolock; Thermo Scientific, Inc.) y 2 µl de buffer transcripción reversa, se incubo a 42°C por 2 min para estabilizar la reacción y posteriormente se adicionó 1µl de enzima reversa transcriptasa (200 unidades/µl; RevertAid H Minus; Thermo Scientific, Inc.). La reacción de transcripción reversa fue incubada a 42°C por 50 min, seguido a 70°C por 15 min y después se enfrió en hielo para detener la reacción. Las muestras de ADN complementario fueron cuantificadas espectrofotométricamente y diluidas a una concentración final de 50 ng/µl.

Los oligonucleótidos específicos para b^{0,+} (SLC7A9), y^{+L} (SLC3A2/SLC7A7), B⁰ (SLC6A19), y 18S fueron designados acorde a las secuencias publicadas en el GenBank (Cuadro 4). Un gen de referencia 18S ARNr (GenBank AY265350) fue usado como control endógeno para normalizar las variaciones en el ARNm. Antes de iniciar, se desarrolló un PCR punto final para estandarizar las condiciones de amplificación para cada uno de los oligonucleótidos, y una alícuota de cada producto de PCR fue secuenciada para confirmar su especificidad en el centro de secuenciación de Davis (Davis, CA). Los resultados de secuenciación demostraron que los productos para b^{0,+}, y^{+L}, B⁰ y 18S ARNr tuvieron 100% de homología con

su correspondiente secuencia adquirida del templado de la secuencia reportada en el GenBank. La expresión de genes (abundancia relativa ARNm) que codifican para $b^{0,+}$, y^+L y B^0 fueron estimados por ensayos de PCR cuantitativo, utilizando SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) usando un Chromo 4-DNA Engine con el MJ Opticon Monitor 3.1 software (Bio-Rad, Herefordshire, England). El equipo fue calibrado con una curva estándar usando el 18S ARNr clonado dentro de un vector TOPO 4.0 a partir del cual se produjo un calibrador de ADNc. La curva estándar utilizándose realizó empleando diluciones seriadas 1:100 vector TOPO con el fragmento de ARNr 18S. Las reacciones para qPCR contenían 50 ng de ADNc, 0.5 μ M de cada uno de los oligonucleótidos específicos, 12.5 μ l de 2XSYBR Green/ROX PCRq Master Mix, y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de PCR que se usaron para amplificación y cuantificación fue desnaturalización (95°C por 1min), 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 30s, alineación 56°C por 15 s, y extensión a 72 °C por 30 s) y un programa de curva de desnaturalización (60-90°C). La fluorescencia se midió al final de cada ciclo y cada 0.2°C durante el programa de desnaturalización. La abundancia relativa de ARNm se normalizó a la abundancia relativa de 18S, calculando la relación entre la abundancia de ARNm y 18S (Liao et al., 2009).

Cuadro 4. Oligonucleótidos para análisis de expresión de ARNm de los transportadores de AA b^{0,+}, y^{+L}, B⁰ y ARNr 18S

ARNm	Iniciador	Loc. en el templado (pb)	Secuencia	Producto (pb)
b ^{0,+} : <i>Sus scrofa</i> Transportador de AA catiónicos b ^{0,+} (SLC7A9, GenBank: EF127857)				
	Sentido	1-19	5'CGGAGAGAGGATGAGAAGT3'	562
	Antisentido	545-562	5'GCCCCGCTGATGATGATGATGA3'	
y ^{+L} : <i>Sus scrofa</i> Transportador de AA catiónicos y ^{+L} (SLC7A7, GenBank: NM001110421.1)				
	Sentido	4239-4258	5'TCAAGTGGGGAACCCTGGTA3'	259
	Antisentido	4548-4567	5'ATGGAGAGGGGCAGATTCCT3'	
B ⁰ : <i>Sus scrofa</i> Transportador de AA neutros B ⁰ (SLC6A19, GenBank: DQ231579.1)				
	Sentido	8-28	5'TCTGTCCACAACAACCTGCGAG3'	205
	Antisentido	193-212	5'CAGCGAAGTTCTCCTGCGTC3'	
ARNr 18S : <i>Sus scrofa</i> ARNm ribosomal 18S (GenBank: AY265350)				
	Sentido	236-255	5'GGCCTCACTAAACCATCCAA3'	295
	Antisentido	511-530	5'TAGAGGGACAAGTGGCGTTC3'	

3.3.5 Análisis de AA en las dietas y AA libres en suero

El análisis de AA fue desarrollado en el laboratorio de Evonik industrias AG, Hanau-Wolfgang, Alemania. Las concentraciones de todos los AA en las dietas, excepto para Trp y Tir, fue determinado por cromatografía de intercambio iónico con detección en post-columna con ninhidrina. Los AA fueron oxidados con ácido per fórmico, neutralizado con metabisulfito de sodio (Llames y Fontaine, 1994; Comisión directiva, 1998; 2000). Los AA fueron liberados de la proteína por hidrolisis con HCL 6N por 24 h a 110°C y cuantificados con un estándar interno por medición de la absorción de productos de reacción con ninhidrina a 570 nm. Triptófano fue determinado por HPLC con detección de fluorescencia (extensión 280 nm y emisión 356nm), después se realizó una hidrolisis alcalino con hidróxido de bario por 20 h a 110°C (Comisión directiva, 1998; 2000). Tirosina no fue determinado.

La concentración de AA libres en suero se analizó mediante cromatografía de intercambio iónico usando un analizador de AA en columna de litio, Biochrom 20 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) y buffers de litio. Los AA fueron determinados después de disolver las muestras de suero liofilizadas y la realización de precipitación de proteínas con ácido sulfosalicílico y centrifugación (30 min a 10000 rpm; temperatura de 20-25°C). Los AA fueron cuantificados usando un estándar interno norleucina por medición de la absorción de productos de reacción con ninhidrina a 570 y 440nm.

3.3.6 Análisis estadístico

El análisis de datos de variables productivas (GDP, CDA y G: C) y de la composición de la canal fue realizado usando el GLM del SAS (Statistical Analysis System 9.1; SAS Inst. Inc., Cary, NC). Se diseñaron los siguientes para probar el efecto de la forma de la dieta con AA, nivel de PC y suplementados con N no esencial en el rendimiento: contraste 1 (C₁), BPAA vs. BPAA+N; Contraste 2 (C₂), BPAA vs. MPAA; y contraste 3 (C₃), BPAA vs. AP. Las medias de los tratamientos de la composición de la canal fueron comparadas por el uso de los siguientes contrastes: C₁, BPAA vs. MPAA, y C₂, BPAA vs. AP. Para las variables moleculares (expresión de genes y concentración de AA en suero), el análisis estadístico de los datos de los tratamientos BPAA y AP fueron realizados por muestra independiente usando pruebas de T utilizando el SAS (Statistical Análisis System 9.1; SAS Inst. Inc.). Los niveles de probabilidad de $P \leq 0.05$ y $0.05 < P \leq 0.10$ fueron definidos como diferencias y tendencias, respectivamente.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Rendimiento del crecimiento

Los resultados comportamiento productivo se presentan en el cuadro 5. El peso inicial y final de los cerdos fue 24.3 y 39.9 kg para BPAA, 24.4 y 39.8 kg para BPAA+N, 24.1 y 39.8 kg para MPAA y 24.3 y 39.2 kg AP, respectivamente. No hubo efecto del contenido de PC de la dieta o la forma (libre vs. Unido a proteína) en el que se añadieron a la dieta sobre la GDP, CDA o la relación G: C ($P > 0.10$). La

suplementación con N no esencial (Gli) a la dieta BPAA no afectó el rendimiento de las variables ($P > 0.10$).

Cuadro 5. Efecto del nivel de PC y de (Libre vs. Unido a proteína) de AA en dietas trigo pasta de soya sobre la GDP, CDA y G:C de cerdos en crecimiento

Variable	Tratamiento dietético ¹					Valor de P^2		
	BPAA	BPAA+N	MPAA	AP	EEM	C ₁	C ₂	C ₃
GDP, Kg	0.762	0.742	0.767	0.729	0.03	0.629	0.904	0.429
CDA, Kg	1.489	1.471	1.567	1.427	0.59	0.824	0.352	0.457
C:G	0.515	0.509	0.490	0.517	0.02	0.793	0.278	0.936

¹BPAA= PC-Bajo (14%) suplementación de la dieta con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen; BPAA+N= como la BPAA pero se adiciona L-Gli como fuente de N; MPAA= contenido intermedio de PC (16%) suplementada con L-Lis HCL, L-Tre, y DL-Met; AP= Dieta alta en PC (22%).

²Contraste 1(C₁)= BPAA vs. BPAA+N; contraste 2 (C₂)= BPAA vs. MPAA; contraste 3 (C₃) = BPAA vs. AP.

3.4.2 Peso de componentes de la canal y órganos

El peso de los componentes de la canal en cerdos al inicio del experimento fue de 10.1 kg para todo el canal, 3.30 kg para hueso de la pierna, 2.55 kg para músculos de la pierna, 1.40 kg músculos del lomo, 7.85 kg músculo total y 0.53 kg de grasa total. Estos valores fueron usados para estimar el peso inicial de los componentes de la canal. El peso final y contenido relativo de los componentes de la canal se muestran en el Cuadro 6. No se observó efecto de la dieta sobre el peso de toda la canal o los componentes separados ($P \geq 0.632$); el contenido relativo no fue afectado $P \geq 0.499$). El promedio de la ganancia diaria de peso de la canal completa y sus componentes (Cuadro 7) no fue afectado por el tipo de dieta ($P \geq 0.414$). Basado en el análisis del contenido de proteína en músculo (20.5%), la tasa de acumulación diaria de proteínas no fue afectada por dieta ($P = 0.529$). Los pesos de los órganos el tracto gastrointestinal tanto como hígado, riñón corazón y bazo (Cuadro 8) no

fueron diferentes entre cerdos alimentados con las dietas BPAA o la MPAA ($P \geq 0.294$). Sin embargo, los pesos de intestino grueso ($P = 0.001$) y riñón ($P = 0.005$) fueron mayores y el bazo tendió a ser menor ($P = 0.073$) en cerdos alimentados con la dieta AP, en comparación con aquellos alimentados con la dieta BPAA. De manera similar, el peso relativo (% de Peso) del intestino grueso ($P = 0.001$), riñón ($P = 0.009$), y estómago ($P = 0.050$) fue mayor en los cerdos alimentados con la dieta AP comparados con los alimentados con la BPAA.

Cuadro 6. Peso final (kg) y contenido relativo (% del peso de la canal) de los componentes de la canal de los cerdos en crecimiento¹

Variable	Tratamiento dietético ²				Valores de P
	BPAA	MPAA	AP	EEM	
Peso final, Kg					
Canal completa	23.86	23.74	24.07	0.733	0.947
Pierna con hueso	7.185	6.913	6.870	0.274	0.688
Musculo de la pierna	5.600	5.465	5.390	0.236	0.812
Musculo del lomo	4.040	4.153	4.273	0.167	0.632
Otros músculos	8.465	8.350	8.728	0.360	0.756
Musculo total	18.105	17.968	18.390	0.537	0.854
Grasa total	1.718	1.738	1.750	0.225	0.995
Contenido relativo, % del peso de la canal					
Lomo con hueso	23.50	24.51	24.36	0.723	0.588
Pierna	30.17	29.10	28.56	0.947	0.499
Musculo de la pierna	23.53	22.99	22.40	0.824	0.640
Musculo del lomo	16.92	17.55	17.76	0.675	0.670
Otros músculos	35.47	35.14	36.23	0.798	0.627
Musculo total	75.92	75.68	76.39	0.570	0.682
Grasa total	7.11	7.31	7.30	0.893	0.984

¹8 Cerdos por tratamiento fueron sacrificados al final del experimento. Cerdos del tratamiento BPAA+N no fueron sacrificados

²BPAA= PC-Bajo (14%) suplementación de la dieta con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen; BPAA+N= como I BPAA pero se adiciono L-Gli como fuente de N; MPAA= contenido intermedio de PC (16%) suplementada con L-Lis HCL, L-Tre, y DL-Met; AP= Dieta alta en PC (22%).

Cuadro 7. Efecto del tratamiento dietético sobre la ganancia de peso de los componentes de la canal, canal completa y acumulación diaria total de proteína en cerdos (g/d)¹

Variable	Tratamientos ²				Valor de P
	BPAA	MPAA	AP	EEM	
Canal completa	563	590	547	22.3	0.414
Lomo con hueso	154	171	161	8.8	0.433
Pierna con hueso	153	150	128	14.9	0.454
Lomo	117	128	126	7.3	0.583
Musculo de la pierna	121	122	103	12.5	0.493
Otros músculos	179	186	182	12.1	0.920
Musculo total	417	436	411	15.9	0.538
Grasa total	55	58	55	11.3	0.985
Acumulación de proteína ³	85.5	89.3	84.2	3.2	0.529

¹8 Cerdos por tratamiento fueron sacrificados al final del experimento. Cerdos del tratamiento BPAA+N no fueron sacrificados

²BPAA= PC-Bajo (14%) suplementación de la dieta con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen; BPAA+N= como la BPAA pero se adiciono L-Gli como fuente de N; MPAA= contenido intermedio de PC (16%) suplementada con L-Lis HCL, L-Tre, y DL-Met; AP= Dieta alta en PC (22%).

³Con base en la ganancia de musculo total y el contenido de proteína analizado en los mismos (20.5%)

Cuadro 8. Efecto del tratamiento dietético sobre el peso de órganos viscerales de cerdos¹

Variable	Tratamiento dietético ²				Valor de F^3	
	BPAA	MPAA	AP	EEM	BP-MP	BP-AP
Peso absoluto. g						
Int. delgado	1.596	1.551	1.733	129.7	0.812	0.476
Int. grueso	756	749	1.084	46.7	0.912	0.001
Hígado	1.131	1.239	1.118	54.9	0.200	0.863
Riñón	221	230	268	8.7	0.496	0.005
Corazón	224	219	209	12.5	0.784	0.419
Estomago	299	315	370	24.9	0.810	0.294
Bazo	91	89	80	7.1	0.655	0.073
Peso relativo, % PV						
Int. delgado	3.71	3.50	4.04	0.293	0.621	0.450
Int. grueso	1.75	1.69	2.53	0.096	0.709	0.001
Hígado	2.62	2.79	2.61	0.110	0.294	0.962
Riñón	0.51	0.54	0.60	0.020	0.352	0.009
Corazón	0.52	0.49	0.49	0.025	0.540	0.418
Estomago	0.69	0.71	0.86	0.054	0.801	0.050
Bazo	0.21	0.20	0.19	0.016	0.669	0.298

¹4 Cerdos por tratamiento fueron sacrificados al final del experimento

²BPAA= PC-Bajo (14%) suplementación de la dieta con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen; BPAA+N= como la BPAA, pero se adiciono L-Gli como fuente de N; MPAA= contenido intermedio de PC (16%) suplementada con L-Lis HCL, L-Tre, y DL-Met; AP= Dieta alta en PC (22%).

³Contrastes: BP-MP= dieta BPAA vs. MPAA; Dieta BP-AP= BPAA vs. AP.

3.4.3 Expresión de genes

Los valores de expresión de genes que codifican para transportadores de AA catiónicos $b^{0,+}$ [*SLC7A9*] y y^+L [*SLC7A7*] y neutral (B^0 [*SLC6A19*]) en el intestino delgado de cerdos alimentados con la dieta BPAA o la AP se presentan en el Cuadro 9. La expresión de $b^{0,+}$ fue mayor ($P= 0.036$) en el duodeno de cerdos alimentados con la dieta BPAA pero no fue diferente en el yeyuno e íleon ($P > 0.10$). No hubo diferencia en la expresión de y^+L en el duodeno y yeyuno ($P > 0.10$), pero en el íleon, la expresión tendió a ser mayor en los cerdos alimentados con la dieta BPAA ($P= 0.098$). La expresión del transportador de AA neutros B^0 no fue diferente entre los cerdos alimentados con la dieta BPAA o la AP en alguno de los 3 segmentos de intestino delgado ($P > 0.10$).

Cuadro 9. Expresión intestinal de transportadores de AA catiónicos y neutros en cerdos en crecimiento alimentados con dietas bajas en proteína (14%) suplementadas con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen (BPAA) y con una dieta alta en proteína (AP) (22%) sin suplementación de AA libres (Unidades arbitrarias)

Transportador de AA	Segmento intestinal	Dieta		EEM	Valor de P
		BPAA	AP		
$b^{0,+}$	Duodeno	0.007	0.014	0.002	0.034
	Yeyuno	0.018	0.026	0.003	0.118
	Íleon	0.012	0.010	0.002	0.480
y^+L	Duodeno	0.018	0.016	0.004	0.599
	Yeyuno	0.033	0.029	0.004	0.435
	Íleon	0.026	0.016	0.004	0.098
B^0	Duodeno	0.010	0.012	0.002	0.541
	Yeyuno	0.057	0.037	0.011	0.199
	Íleon	0.017	0.015	0.003	0.631

La expresión relativa de los transportadores de AA en el yeyuno, comparando con duodeno e íleon, es presentado en la Figura 3. En cerdos alimentados con la dieta BPAA, la expresión de $b^{0,+}$ en el yeyuno no fue diferente de duodeno e íleon ($P > 0.10$). Pero en cerdos alimentados con la dieta AP, la expresión de $b^{0,+}$ en el yeyuno fue mayor comparado con duodeno ($P < 0.05$) o íleon ($P < 0.01$). La expresión de y^+L en el yeyuno de cerdos alimentados con la dieta BPAA tendió ($P = 0.10$) a ser mayor comparado con duodeno, pero no fue diferente con íleon ($P > 0.10$). En cerdos alimentados con la dieta AP la expresión de y^+L en yeyuno fue mayor comparada con la de duodeno o íleon ($P=0.05$) comparado con la de duodeno o íleon, independientemente del tratamiento dietético.

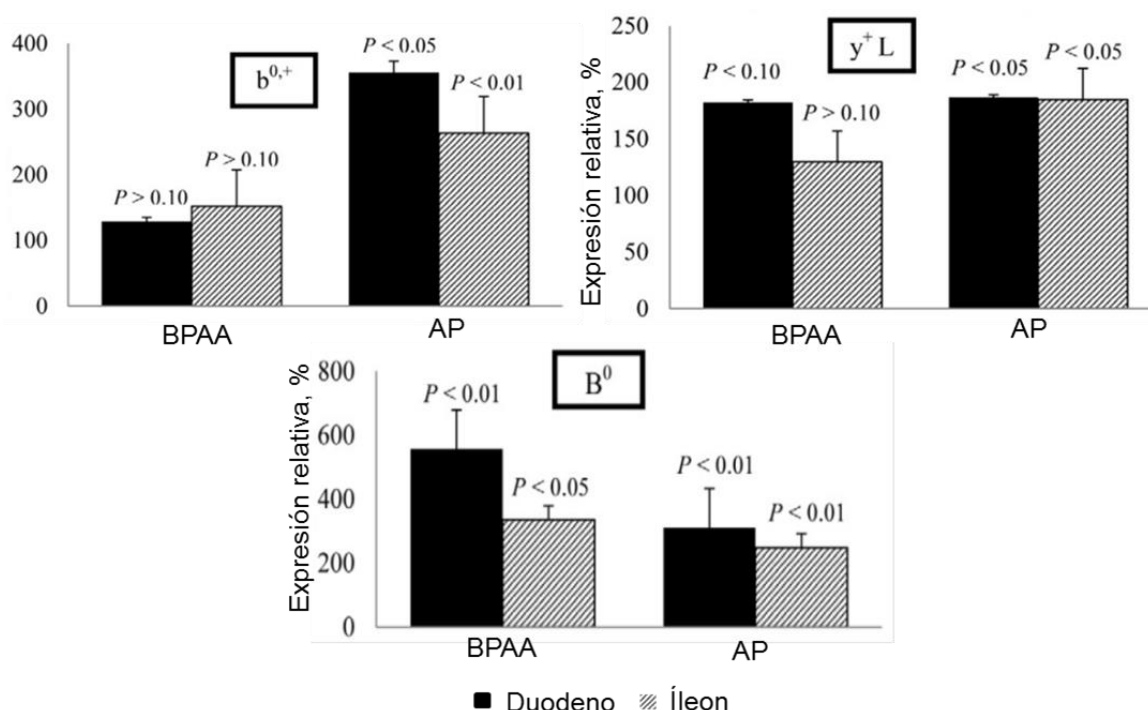


Figura 3. Expresión relativa de transportadores de AA $b^{0,+}$, y^+L , y B^0 en yeyuno, expresada en porcentaje de su expresión en duodeno o íleon en los ocho cerdos alimentados con dieta baja en PC (14%) suplementación de la dieta con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen (BPAA) y dieta alta en proteína (AP) (22%) no suplementada con AA libres.

3.4.4 Concentración de AA en suero

La concentración de AA libres esenciales y no esenciales en suero en horario postprandial en cerdos alimentados con la dieta BPAA y AP se presenta en el Cuadro 10. La concentración sérica de Arg ($P=0.037$), His ($P= 0.015$), Iso ($P= 0.007$), Leu ($P= 0.024$), Fen ($P = 0.006$) y Val ($P= 0.017$) fue mayor en los cerdos alimentados con la dieta AP. En contraste, la concentración de Lis ($P < 0.001$) y Met ($P=0.003$) fue mayor en suero en cerdos alimentados con la dieta BPAA. La concentración de Tre en suero no fue diferente entre tratamientos ($P= 0.678$). Respecto a los AA no esenciales, Glu en suero fue menor ($P < 0.05$), mientras que para Asp y Ser fue mayor ($P= 0.01$) y Gln tendió a ser menor ($P < 0.10$) en cerdos alimentados con la dieta AP; no se encontró diferencia en la concentración en suero de Ala, Asp, Gli y Pro ($P > 0.10$).

Cuadro 10. Concentración sérica post-prandial (mg/100mL) de AA libres de cerdos en crecimiento alimentados con una dieta baja en PC (14%) suplementación de la dieta con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen (BPAA) y dieta alta en proteína (AP) (22%) no suplementada con AA libres.

Aminoácido	BPAA	AP	EEM	Valor de P
Esenciales				
Arg	2.66	4.74	0.55	0.037
His	0.93	1.80	0.18	0.015
Iso	1.69	3.09	0.25	0.007
Leu	2.55	3.41	0.27	0.024
Lis	4.85	1.79	0.27	0.000
Met	0.81	0.25	0.08	0.003
Fen	1.34	2.46	0.19	0.006
Tre	2.19	2.02	0.27	0.678
Val	3.15	4.48	0.30	0.017
No esenciales				
Ala	0.92	8.67	0.67	0.324
Asn	0.74	1.65	0.15	0.006
Asp	0.26	0.24	0.03	0.580
Gln	9.88	8.47	0.49	0.090
Glu	4.15	2.01	0.46	0.016
Gli	7.20	7.55	0.50	0.639
Pro	5.17	5.76	0.77	0.612
Ser	2.04	3.51	0.23	0.004

3.5 DISCUSIÓN

La mayoría de los AA suelen ser liberados de las proteínas en yeyuno; por lo tanto, este segmento intestinal es el sitio donde se lleva a cabo la mayoría de la absorción de AA (Silk et al., 1985). De acuerdo con ello, cuando los cerdos son alimentados con dietas que contienen mayormente proteína unida a AA se espera que la abundancia de los transportadores de AA sea mayor en la mucosa de yeyuno comparado con la de duodeno e íleon. En el presente estudio, la dieta BPAA fue suplementada con casi todos los AA en forma libre (excepto por Arg), a niveles que van desde 0.04% (Trp) a 0.65% (Lis). Estos AA libres pueden ser más disponibles

para absorción en duodeno comparados con AA unidos a proteína, sin embargo la información con respecto a la abundancia de transportadores de AA en estos segmentos intestinales es limitada. Por otra parte, todos los AA en la dieta AP estaban presentes exclusivamente en la forma AA unidos a proteína. Por lo tanto, el primer objetivo de este estudio fue analizar la expresión de transportadores de AA en los 3 segmentos intestinales de cerdos y determinar si los AA libres en la dieta BPAA afectan la expresión de sus transportadores en cada segmento intestinal. La lisina y los transportadores de AA neutros son de particular interés por que Lis es el primer AA limitante en muchas dietas para cerdos, y los AA neutros, especialmente Leu, interactúan con Lis para su absorción.

Lisina es absorbida mayormente en el intestino delgado por el transportador de AA catiónicos $b^{0,+}$ (Broer, 2008). Este transportador se expresa mayormente en la membrana apical de células epiteliales de varias especies de animales (Torras-Llort et al., 2001). Su función es de antiporte intercambiando Leu por Lis, de modo que la absorción de Lis esta acoplada con el flujo de salida de Leu (Pineda et al., 2004). Recientemente se reportó que $b^{0,+}$ es más expresado en el yeyuno de cerdos en crecimiento a pesar del exceso de Leu reduce su tasa de expresión (García-Villalobos *et al.*, 2012; Morales et al., 2013). En el presente experimento, $b^{0,+}$ se expresó en todos los segmentos intestinales de cerdos alimentados con la dieta BPAA o AP. Wang et al., (2009) también reporto que la expresión de $b^{0,+}$ en el duodeno, yeyuno e íleon de cerdos tibetanos. Nosotros estamos particularmente interesados en saber si los AA libres y unidos a proteína afectan diferentemente la expresión de $b^{0,+}$ en el duodeno, porque 65% de Lis en la dieta BPAA fue suministrada en forma libre mientras la dieta AP contenía solo Lis unida a proteína. Hatzoglou et al., (2004) demostró que los transportadores de AA son dependientes de la presencia de su sustrato. Por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que la dieta con AA libres tendría un efecto más fuerte sobre la estimulación de $b^{0,+}$ en duodeno que en la dieta con los AA estan unidos a proteína. En efecto, la expresión duodenal de $b^{0,+}$ fue 2 veces mayor en los cerdos alimentados con la dieta BPAA en comparación con los alimentados con la dieta AP. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la Lis libre ejerce un efecto marcado sobre la expresión de $b^{0,+}$

comparado con los AA unidos a proteína y que la absorción duodenal de la dieta con Lis libre puede ser mayor que cuando Lis está unida a proteína. La falta de diferencia en la expresión en yeyuno entre los cerdos alimentados con la dieta BPAA o AP coincide con los resultados de Zhang et al. (2013). Por otro lado, la mayor expresión de $b^{0,+}$ en el yeyuno de los cerdos alimentados con la dieta AP está de acuerdo con informes anteriores que indican que el yeyuno es el segmento principal intestinal donde se lleva a cabo la mayor absorción de AA (Silk et al 1985). De acuerdo con estos resultados se sugiere que la forma en que se incluye Lis en la dieta la expresión de $b^{0,+}$ en el intestino delgado se afecta diferentemente, esto a su vez puede afectar a la disponibilidad (concentración serica) de Lis.

El sistema y^+L media el transporte de AA catiónicos (Lis, Arg y Ornitina) a través de la membrana basolateral del enterocito (Broer, 2008). Este transportador intercambia AA catiónicos y AA grandes neutros, especialmente Leu, con mayor afinidad (Pfeiffer et al., 1999). Al parecer hay una actividad complementaria entre y^+L y $b^{0,+}$ en el proceso de llevar AA catiónicos desde la luz intestinal a la sangre circulante y tejidos, y median el flujo de salida de AA neutros proveniente de la sangre a cambio de AA catiónicos. No hay informes disponibles que muestren la expresión de y^+L en cerdos. En el presente experimento, el tipo de dieta no afecto la expresión de y^+L en duodeno y en yeyuno, pero en íleon tendió a ser menor en los cerdos alimentados con la dieta AP. No hay explicación clara para esta expresión diferencial. Por otro lado, los cerdos alimentados con la dieta BPAA tendieron a expresar más y^+L en yeyuno que en duodeno, pero en los cerdos alimentados con la dieta AP, la expresión de y^+L fue mayor en yeyuno comparada tanto en duodeno e íleon. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la forma (libre vs. unido a proteína) en el que los AA están incluidos en la dieta, afecta el sitio de expresión de y^+L en cerdos en crecimiento.

Esta respuesta diferencial puede explicarse como resultado de diferencias en la disponibilidad de AA para absorción; los AA libres en la dieta son fácilmente disponibles, mientras que unidos a proteína tienen que ser digeridos antes de ser liberados de la proteína de la dieta.

El sistema B⁰ es el principal transportador de AA neutros en el intestino delgado (Broer, 2008). Este está localizado exclusivamente en la membrana apical del enterocito y transporta todos los AA neutros con alta preferencia por Leu, Ile, Val y Met (Reimer et al., 2000). La expresión de B⁰ en el yeyuno no fue afectada por la suplementación con AA de cadena ramificada (Zhang et al., 2013) pero el análisis de la expresión de B⁰ en duodeno e íleon no ha sido reportada. En el presente estudio, la expresión de B⁰ no fue afectada por la forma en que los AA fueron incluidos en la dieta en ninguno de los segmentos del intestino delgado. Esta falta de efecto se atribuye en parte al hecho de que la dieta BPAA contenía menos del 20% de AA neutros en forma AA libre, en comparación con Lis, que se añadió en su mayoría en forma libre. Suponiendo un flujo normal de Leu dentro de enterocito que cruza la membrana apical a través del sistema B⁰ y la membrana basolateral a través del sistema y⁺L (Broer, 2008), se esperaría un flujo adecuado de AA neutros, lo que a su vez podría ayudar a sostener la absorción intestinal de AA catiónicos a través de b^{0,+}. La expresión de este transportador de AA en duodeno, yeyuno e íleon de cerdos alimentados con la dieta suplementada con AA libres sugiere un flujo dinámico de AA catiónicos y neutros que ingresan a través de la membrana apical y basolateral del enterocito a lo largo de todo el intestino delgado, lo que es comparable con los cerdos alimentados con la dieta AP.

En ratones, el transportador B⁰ se expresa de forma similar en todos los segmentos (duodeno, yeyuno e íleon) del intestino delgado (Romero et al., 2006) y en humanos, la expresión B⁰ incrementa de duodeno a íleon (Terada et al., 2005). Sin embargo, no existen reportes disponibles sobre el patrón de expresión de B⁰ e los diferentes segmentos de intestino delgado de cerdos. En el presente estudio, a pesar de que B⁰ fue expresado en duodeno e íleon, su expresión en yeyuno fue substancialmente mayor que los otros dos segmentos intestinales. Estos datos sugieren diferencias en los patrones de expresión entre especies y confirman los reportes indican que el yeyuno de los cerdos es el principal segmento intestinal en donde se lleva a cabo la absorción de AA.

La concentración de AA libres en suero de sangre colectada dentro de las 3 primeras horas post-prandial refleja la composición de AA de la dieta consumida por los cerdos (Langer y Fuller, 2000; García-Villalobos et al 2012) y de la forma (libre vs. unido a proteína) en el cual los AA son ingeridos con la dieta (Yen et al., 2004). En el presente experimento, el contenido total de Arg, His, Iso, Leu, Fen, Thr y Val fue entre 26 (Thr) y 95% (Arg) mayor en la dieta AP que en la BPAA. De acuerdo con estos reportes, la concentración de suero de estos AA refleja la composición de AA de la dieta consumida por los cerdos. Los valores de suero de Arg, His, Iso, Leu, Fen, Tre y Val en cerdos alimentados con la dieta AP fue entre 33 (Leu) y 94% (His) mayor comparado con la dieta BPAA. Esta respuesta está de acuerdo con lo que reporto Zhang et al. (2013). En contraste, el contenido total de Lis en la dieta no fue diferente entre las dietas BPAA y AP, pero la dieta BPAA contenía cerca de 65% de Lis en forma libre, mientras que la dieta AP contiene este AA exclusivamente como AA unido a proteína. La concentración de Lis en suero de cerdos alimentados con la dieta BPAA fue acerca de 63% mayor; esta diferencia corresponden a la mayor expresión de $b^{0,+}$ en duodeno de los mismos cerdos. La mayor concentración de Met se explica por el alto contenido de Met libre en la dieta BPAA. Sin embargo, los resultados del presente experimento indican que 1) la concentración de AA en suero refleja tanto la composición de AA de la dieta como la forma (libre vs. unida a proteína) en que los AA fueron consumidos y 2) puede reflejar una diferente abundancia y actividad de los transportadores de AA localizados en cada uno de los segmentos del intestino delgado. A pesar de que el contenido de Tre libre en la dieta BPAA no fue mayor, Tre en suero no fue diferente entre los cerdos alimentados con la dieta BPAA o la AP, lo cual es explicado por el hecho de que Tre es mayormente metabolizada en el intestino delgado (Schaart et al., 2005).

El segundo objetivo de este estudio fue determinar si el comportamiento productivo de los cerdos alimentados con la dieta AP no fue diferente de los cerdos alimentados con la dieta BPAA formulada bajo el concepto de proteína ideal. Las dietas contenían 2 a 4 unidades porcentuales de PC por debajo del nivel para cubrir los requerimientos de Lis (primer AA limitante), acoplado con la suplementación de Lis y Tre libres, lo cual no afectó el comportamiento de los cerdos (Tuitoek et al., 1997;

le Bellego et al., 2002). Sin embargo, la reducción en el rendimiento y el mayor grosor de la grasa dorsal se han reportado cuando se reduce el contenido de PC en un 4% o más en las dietas de maíz o sorgo- pasta de soya (Tuitoek et al., 1997; Kerr and Easter, 1995; Guay et al., 2006). El sistema de energía (EM vs. EN) usado para la formulación de dietas (Noblet et al., 1994), contenido de energía (Kerr et al., 2003), perfil de AA y consumo de alimento restricción vs. *ad libitum* (Yen et al., 2004), se cree que son los responsables de un pobre desempeño. En el presente experimento, los cerdos fueron alimentados *ad libitum*, todas las dietas fueron formuladas usando los valores de EN, y la relación AA esencial: Lis en la dieta BPAA, excepto para Arg, fue balanceada de acuerdo al concepto de proteína ideal (NRC, 2012). Reduciendo el contenido alrededor de 6 (MPAA) y 8 (BPAA) unidades porcentuales, en el presente experimento no se afectaron GDP, CDA y G:C de los cerdos en crecimiento; la composición de la canal y acumulación de proteína tampoco fue diferente. De acuerdo con Ker et al. (2003), ellos reportaron que no hay diferencias en GDP y composición de la canal entre los cerdos alimentados con dietas altas en proteína o bajas en proteína con contenido similar de EN. Un comportamiento similar fue reportado por Yi et al. (2010). La diferente disponibilidad (concentración de suero) entre AA libres o unidos a proteína en cerdos alimentados con dietas bajas en proteína y, dietas suplementadas con AA también parecen explicar el pobre rendimiento reportado previamente. Los AA libres aparece más rápido en sangre portal que AA unidos a proteína cuando los cerdos son alimentados una vez al día (Yen et al., 2004). Por lo tanto, la diferente tasa de absorción entre AA libres y unidos a proteína pueden inducir a oxidación (Rerat et al., 1992) y reducir su biodisponibilidad cuando los cerdos son alimentados una vez al día (Yen et al., 2004) pero no cuando son alimentados *ad libitum*. La discrepancia entre nuestros resultados y los de Guay et al. (2006), quienes reportaron un pobre comportamiento en cerdos alimentados con dietas con 6% de PC por debajo del control, esto puede atribuirse al hecho que los cerdos se alimentaron dos veces al día. Por lo tanto, la concentración de AA en suero, comportamiento y composición de la canal de nuestro estudio indican que los cerdos alimentados *ad libitum* pueden

usar dietas bajas en contenido de proteína, suplementadas con AA y ser tan eficientes como si se consumieran dietas altas en proteína.

La composición de dieta afecta el peso de algunos órganos del tracto gastrointestinal de cerdos (Yen, 1997). En el presente experimento, el peso de intestino grueso y riñón de cerdos alimentados con la dieta AP fueron un 43 y 21%, mayor respectivamente, que en los alimentados con la dieta BPAA. Resultados similares fueron reportados por Nieto et al. (2003) en cerdos Ibéricos alimentados con dietas que contenían niveles PC entre 10 a 22%. El mayor peso de riñón en cerdos alimentados con la dieta AP puede indicar un incremento de la actividad renal para eliminar el exceso de AA consumidos con esta dieta; los cerdos alimentados con la dieta AP consumieron alrededor de 60% de exceso de N (NRC, 2012). Estos resultados sugieren que la mayor ganancia de peso vivo más alta observada en los cerdos alimentados con dietas AP, es explicada parcialmente por el mayor peso de órganos en los cerdos que fueron alimentados con las dietas bajas en proteína suplementadas con AA.

El requerimiento total de DIE de nitrógeno no esencial para cerdos en crecimiento es 2.11% (NRC, 2012). La dieta AP usada en el presente experimento contiene 2.51% DIE de N no esencial, lo que excede la recomendación del NRC (2012) por 16%, pero la dieta BPAA apenas reunió la recomendación (2.20%). Además, ciertos AA no esenciales tales como Gli, parecen ser necesarios cuando las dietas de maíz-pasta de soya se formularon con altos niveles de AA libres para alcanzar la relación óptima de los primeros cinco AA limitantes (Kendall et al., 2004). Se especula que la suplementación de Gli en las dieta BPAA, puede incrementar la DIE de N no esencial en casi un 16% en la dieta BPAA+N, lo que podría mejorar el rendimiento de cerdos. Sin embargo, no hubo diferencias en GDP, CDA, o la relación G: C entre los cerdos alimentados con la dieta BPAA o la BPAA+N; además, el comportamiento de los cerdos alimentados con estas dietas no fue diferente al de los cerdos alimentados con MPAA o incluso con la dieta AP. Se ha reportado que para suministrar suficiente N no esencial para cerdos en crecimiento las dietas deben ser formuladas con una relación Lis total: PC no mayor de 7.1% que (Ratliff *et al.*,

2005) La dieta BPAA en el presente estudio tuvo una relación de Lis total: PC de 7.0 lo que sugiere que suficiente N fue administrado. El contenido de N no esencial y Gli en el trigo es aproximadamente 25 % mayor en comparación con el maíz (Lin et al., 1987), lo que puede explicar la falta de respuesta a la adición de Gli en la dieta BPAA. Por lo tanto, estos resultados pueden indicar que la dieta trigo-pasta de soya BPAA usada en el presente experimento suple suficientemente la DIE de N no esencial y Gli para cerdos dentro de peso promedio de 24 a 40 kg.

En resumen, los AA libres en la dieta BPAA incrementaron la expresión del transportador de AA catiónicos en $b^{0,+}$ en duodeno, pero no hubo efecto sobre la expresión de y^+L o en el transportador de AA neutros B^0 en ninguno de los segmentos intestinales. La expresión de todos los transportadores de AA fue mayor en yeyuno de cerdos alimentados con la dieta AP que en y^+L y B^0 en los cerdos alimentados con la dieta BPAA; sin embargo, la expresión de $b^{0,+}$ en duodeno no fue diferente a yeyuno de los cerdos alimentados con la dieta BPAA. La concentración de suero de Lis y Met, que fueron adicionadas en forma libre a niveles significativamente altos, fue mayor en cerdos alimentados con la dieta BPAA, pero el resto de AA esenciales estuvieron más concentrados en el suero de los cerdos alimentados con la dieta AP. No obstante, el comportamiento del cerdo y composición de la canal no afectaron por las dietas suministradas. Al parecer los cerdos alimentados con dietas bajas en proteína suplementadas con altos niveles de Lis libre realizan ciertos ajustes a su fisiología para modificar su patrón de absorción. En conclusión, la adición de AA libres a dietas con nivel bajo de proteína parecen afectar la expresión del transportador de AA catiónicos $b^{0,+}$ en duodeno y la concentración sérica del primer AA limitante. También se concluye que el contenido de PC de la dieta se puede reducir sustancialmente (hasta unidades de 8%) sin afectar el comportamiento y la composición de a canal de cerdos en crecimiento alimentados ad libitum con dietas trigo-pasta de soya formuladas con el sistema de EN y bajo el concepto de proteína ideal.

4. CAPITULO 2

4.1 Los niveles de proteína y aminoácidos libres en la dieta afectan la actividad de proteasas pancreáticas, expresión de transportadores de aminoácidos y concentración de aminoácidos en suero de cerdos en iniciación

ABSTRACT

The dietary contents of crude protein and free amino acids (AA) may affect the protein digestion and AA absorption in pigs. Trypsin and chymotrypsin activities, AA serum concentrations and expression of AA transporters in the small intestine of pigs fed a low protein, AA-supplemented (19.2%, LPAA) or a high protein (28.1%, HP), wheat-soybean meal diet were measured in two 14-d trials. The LPAA diet contained free L-Lys, L-Thr, DL-Met, L-Leu, L-Ile, L-Val, L-His, L-Trp and L-Phe. All pigs were fed the same amount of feed (890 and 800 g/d for trial 1 and 2 respectively). In trial 1, samples of mucosa (duodenum, jejunum and ileum) and digesta (duodenum and jejunum) were collected from 14 pigs (17.2 ± 0.4 kg); in trial 2, blood samples were collected from 12 pigs (12.7 ± 0.3 kg). The trypsin and chymotrypsin activities in both intestinal segments were higher in pigs fed the HP diet ($p < 0.01$). Trypsin activity was higher in jejunum than in duodenum regardless the dietary treatment ($p < 0.05$). Pigs fed the LPAA diet expressed more b^{0,+}AT in duodenum, B0AT1 in ileum ($p < 0.05$), and tended to express more γ -LAT1 in duodenum ($p = 0.10$). In pigs fed the LPAA diet, the expression of b^{0,+}AT was higher in duodenum than in jejunum and ileum ($p < 0.01$), but no difference was observed in pigs fed the HP diet. Ileum had the lowest b^{0,+}AT expression regardless the diet. The serum concentrations of Lys, Thr and Met were higher in LPAA pigs while serum Arg was higher in HP pigs ($p < 0.05$). Serum concentrations of AA appear to reflect the AA absorption. In conclusion, these data indicate that the dietary protein contents affect the extent of protein digestion and that supplemental free AA may influence the intestinal site of AA release and absorption, which may impact their availability for growth of young pigs.

Keywords: pigs, amino acid transporters, protease activity, serum amino acids.

RESUMEN

El contenido de proteína cruda y aminoácidos libres (AA) en la dieta puede afectar la digestión de proteínas y absorción de AA en cerdos. La actividad de tripsina y quimotripsina, la concentración de AA en suero y expresión de transportadores de AA en el intestino delgado de cerdos alimentados con una dieta baja en proteína, suplementados con AA (19.2%, BPAA) o con niveles altos en proteína (28.1%, AP), en una dieta trigo-pasta de soya fueron medidas en 2 experimentos por 14 días. La dieta BPAA contenía AA libres, L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Ile, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen. Todos los cerdos fueron alimentados con la misma cantidad de alimento (890 y 800 g/d por experimento 1 y 2 respectivamente). En el experimento 1, se colectaron muestras de mucosa (duodeno, yeyuno e íleon) y digesta (duodeno y yeyuno) de 14 cerdos (17.2 ± 0.4 kg); en el experimento 2, se colectaron muestras de sangre de 12 cerdos (12.7 ± 0.3 kg). La actividad de tripsina y quimotripsina en ambos segmentos intestinales fue mayor en cerdos alimentados con la dieta AP ($p < 0.01$). La actividad de tripsina fue mayor en yeyuno que en duodeno independientemente del tratamiento dietético ($p < 0.05$). En los cerdos alimentados con la dieta BPAA se encontró mayor expresión de $b^{0,+}$ AT en duodeno, B0 AT1 en íleon ($p < 0.05$), y una tendencia a incrementar la expresión de $y+LAT1$ en duodeno ($p = 0.10$). En cerdos alimentados con la dieta BPAA, la expresión de $b^{0,+}$ AT fue mayor en duodeno que en yeyuno e íleon ($p < 0.01$), pero no se observó diferencia en los cerdos alimentados con la dieta AP. En íleon se observó una tendencia a reducir la expresión de $b^{0,+}$ AT independientemente de la dieta. Las concentraciones de suero de Lis, Tre y Met fueron mayores en cerdos alimentados con la dieta BPAA mientras que la concentración de Arg en suero fue mayor en los cerdos alimentados con la dieta AP ($p < 0.05$). La concentración de AA en suero es un reflejo de su absorción. En conclusión, estos datos indican que el contenido de proteína en la dieta afecta el grado de digestión de la proteína y que la suplementación con AA libres puede influenciar el sitio de absorción, el cual puede impactar su disponibilidad para cerdos jóvenes y en crecimiento.

4.2 INTRODUCCIÓN

La suplementación de dietas bajas en proteína con AA libres para cerdos mejora el perfil de AA y reduce la excreción de N (Carter et al., 1996). Actualmente están disponible en el mercado cinco AA libres esenciales, grado alimenticio, los cuales pueden ser incluidos en dietas experimentales, cuando son adicionados adecuadamente, y reducir sustancialmente el contenido de proteína. Las dietas bajas en proteína suplementadas con AA pueden contener hasta 60% libre de Lis y apenas el 40% de Lis unido a la proteína (UP). Los AA libres están disponibles para su absorción a medida que alcanzan la parte proximal del intestino delgado pero los AAUP necesitan ser liberados durante la digestión de proteína antes de que su absorción se lleve a cabo. Así, el contenido de AAUP y AA libres en la dieta puede afectar el sitio de absorción de AA en el intestino delgado de cerdos.

La concentración de proteína en la digesta del intestino delgado, que refleja el contenido de proteínas de la dieta, parece afectar la secreción de proteasas pancreáticas en animales. Las ratas alimentadas con dietas bajas en proteínas secretan menos tripsina y quimotripsina pancreática que aquellas que son alimentadas con dietas altas en proteínas (Green et al., 1986; Fushiki and Iwai, 1989). Además, la disponibilidad de AA libres parece afectar la abundancia de transportadores en el intestino delgado de cerdos (Morales et al., 2013). La absorción de Lis es crítica porque es el primer AA limitante en muchos ingredientes para cerdos. Lis es absorbida a través de los sistemas $b^{0,+}AT$ (Majumder et al., 2009) y $y^{+}LAT1$ (Broer, 2008) a cambio de un AA neutro (Leu). El sistema $B^{0}AT1$ es el mayor transportador de Leu (Broer, 2008). Nuestra hipótesis fue que la actividad de proteasas pancreáticas se reduce en cerdos alimentados con dietas bajas en proteína, y que la suplementación con AA libres estimula la abundancia (expresión) de ARNm que codifican para transportadores de AA a lo largo de todo el intestino delgado. En consecuencia, la absorción y concentración de AA en suero puede ser afectada. Sin embargo, estos datos no están disponibles respecto a nuestra suposición en cerdos jóvenes.

El objetivo del presente estudio fue comparar el efecto en la alimentación de cerdos con una dieta baja en proteína suplementada con AA libres y otra alta en proteína sin AA libres sobre: i) la actividad de tripsina y quimotripsina en digesta duodenal y yeyuno, ii) la expresión de transportadores de dos AA catiónicos y un AA neutro en duodeno, yeyuno e íleon, iii) la concentración de AA libres en suero. La actividad de enzimas y la expresión de transportadores entre los segmentos intestinales también fueron comparadas.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Animales, instalaciones y dietas experimentales

Los cerdos usados en este estudio fueron cuidados de acuerdo con las guías establecidas en la Norma Oficial Mexicana sobre el cuidado animal (Norma oficial mexicana, 2001). Dos experimentos fueron conducidos con 26 cerdos cruzados (Large White x Duroc). 14 cerdos (peso inicial de 17.2 ± 1.4 kg) y 12 cerdos (peso inicial de 12.7 ± 0.6 kg) fueron usados en el experimento 1 y 2 respectivamente. En ambos experimentos, los cerdos fueron aleatorizados a dos de los tratamientos dietéticos: 1) dieta baja en proteína suplementada con AA libres, y 2) dieta alta en proteína no suplementada con AA libres. Se utilizaron 7 réplicas por tratamiento (5 hembras y 2 machos castrados) en el experimento 1 y 6 repeticiones (4 hembras y 2 machos castrados) en el experimento 2. El peso inicial fue equilibrado entre tratamientos. Los cerdos fueron alojados en forma individual en jaulas metabólicas con piso elevado (1.2m ancho, 1.2m largo y 1.0m alto) equipadas con un bebedero tipo chupón, el piso con una malla de hierro, y la temperatura de la sala controlada (22-24 °C).

En ambos experimentos, todos los cerdos fueron entrenados para consumir la misma cantidad de alimento (2 comidas, ofreciendo la misma cantidad diariamente a las 0700 y 1900h) en 30 min o menos. Los cerdos tuvieron acceso *ad libitum* al agua. Ambos experimentos consistieron de 7 días para adaptación a las dietas y jaulas metabólicas, seguido de 7 días para la evaluación de la respuesta. El

promedio de peso vivo de los cerdos al final del experimento 1 y 2, fue 23.2 y 16.7kg respectivamente.

Cuadro 11. Composición de las dietas experimentales

Ingrediente, %	BPAA*	AP ^x
Trigo	85.88	51.12
Pasta de soya, 48%	9.00	41.00
Aminoácidos premix	2.43	-
Carbonato de calcio	1.56	1.53
Fosfato dicálcico	0.58	1.00
Sal ionizada	0.35	0.35
Premezcla de vit. y min [†]	0.20	0.20
Aceite de canola	-	4.80

* BPAA: dieta baja en PC (19%) adicionada con 0.76% L-Lis HCL, 0.35% L-Tre, 0.21% DL-Met, 0.05% L-Trp, 0.16% L-Fen, 0.37% L-Leu, 0.18% L-Iso, 0.12% L-His, y 0.23% L-Val.

^xAP: Dieta alta en PC, sin la adición de AA libres.

[†]Cada kg de dieta contenía: Vitamina A, 4800 UI; vitamina D3, 800 UI; vitamina E, 4.8 UI; vitamina K3, 1.6 mg; Fe (sulfato ferroso), 64 mg; Cu (sulfato de cobre) 4mg; Mn (Sulfato de manganeso), 4mg; I (ioduro de potasio), 0.36 mg; Se (selenito de sodio), 0.13 mg.

Los dos tratamientos dietéticos fueron en base a trigo y pasta de soya como sigue: 1) Baja en proteína (19.2%) dieta suplementada con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen (BPAA); y 2) Alta en proteína (28.1%) dieta (AP) sin AA libres (Cuadro 11). La dieta AP fue formulada para reunir la digestibilidad ileal estandarizada (DIS) de lisina para cerdos con un rango de 11 -25 kg (NRC, 2012). La dieta BPAA fue formulada para contener un optima relación AA: Lis (NRC, 2012). Estas dietas fueron formuladas usando el contenido de AA y los coeficientes de DIE publicadas en trigo y pasta de soya (Stein et al., 2001); la DIE de AA libres se considera que es igual a 100%. Las dietas BPAA y AP contenían 9% y 41% de SBM respectivamente. La dieta BPAA contenía aproximadamente 50% Lis-UP y 50% Lis libre mientras que en la dieta AP, Lis estaba completamente en forma de proteína.

Se evaluaron estas dietas para probar la hipótesis de que la actividad de tripsina y quimotripsina, la expresión de los transportadores de AA y la concentración de AA libres en suero en los cerdos alimentados con una dieta BPAA son diferentes en comparación con los alimentados con una dieta AP. La composición de AA analizados de ambas dietas se presenta en el cuadro 12. Todas las dietas se complementaron con una premezcla de vitaminas y minerales para cumplir o exceder sus requerimientos para cerdos en crecimiento (NRC, 2012), y contenía 10.2 MJ NE /kg.

Cuadro 12. Composición analizada de PC y AA de las dietas experimentales BP suplementada con AA y dieta AP (base tal como se ofrece)

Aminoácido, %	Dietas	
	BPAA	AP
PC	19.18	28.05
Esenciales		
Arg	0.89	1.73
His	0.53	0.71
Iso	0.82	1.21
Leu	1.56	2.1
Lis	1.24	1.42
Met	0.42	0.42
Fen	0.95	1.37
Tre	0.86	0.97
Val	0.97	1.31
No esenciales		
Ala	0.61	1.19
Asp	1.14	2.56
Glu	4.53	5.84
Gli	0.63	1.08
Pro	1.43	1.74
Ser	0.73	1.12
Tir	0.43	0.81

4.3.2 Colección de tejidos y muestras sanguíneas

Se colectaron muestras de mucosa de duodeno, yeyuno e íleon de todos los cerdos del experimento 1. Los cerdos fueron sacrificados a través de aturdimiento por descarga eléctrica seguido de desangrado a las 2.5 h después de la alimentación de la mañana en el día 14. La canal fue eviscerada inmediatamente, y se colectaron muestras de raspado de mucosa de duodeno, yeyuno e íleon (aprox. 0.5g) en microtubos de 2 ml. Además, se tomaron muestras de digesta de duodeno y yeyuno de todos los cerdos para medir la actividad de tripsina y quimotripsina. Las muestras de mucosa fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -82°C hasta su análisis. El proceso de colección de muestras tomó un tiempo de 8 min para maximizar la calidad del RNA extraído. Las muestras de digesta intestinal se almacenaron a -20°C para su posterior análisis. Las muestras sanguíneas de todos los cerdos de ambos experimentos fueron colectadas acorde al siguiente protocolo. Los cerdos fueron alimentados con sus correspondientes comidas de la mañana en el día 14 después de 11h de ayuno. Las muestras de sanguíneas (aprox. 7ml) se colectaron por venopunción de la arteria carótida 2.5 h después de la comida de la mañana para analizar la concentración de AA en lípidos durante el estado absorptivo. Inmediatamente después de la colección, las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm, a 4°C por 10 min para separar el suero de las células sanguíneas y después fue almacenado a -20°C hasta su análisis.

4.3.3 Actividad enzimática

Las muestras de digesta de duodeno y yeyuno se descongelaron y centrifugaron a $3000 \times g$, 4°C , por 15 min (Eppendorf Centrifuge 5810r, Hamburg, Germany). El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. La actividad de tripsina y quimotripsina en la digesta fue analizada siguiendo los procedimientos de Hummel (1959). Para tripsina, la densidad óptica fue leída a 247nm, con intervalos de 1min, por 10 min (spectronic Helios β , Thermo Electron Co. Cambridge, UK). Una unidad de actividad fue definida como hidrólisis de 1 μmol de $\text{N}\alpha$ -p-toluenesulfonil-L-Arginina metil ester por minuto a 25°C y con un pH 8.1 en presencia de 0.01M del ion calcio. Para quimotripsina, la densidad óptica fue leída a 256 nm, con intervalos

de 1 min, por 10 min. Una unidad de actividad fue definida como el hidrolisis de 1 μmol de N-benzoil-L-tirosina etil ester por minuto a 25°C y un pH de 7.8.

4.3.4 Extracción y purificación de ARN total

Las muestras de mucosa intestinal fueron tratadas para extracción de ARN total a través de pulverización dentro de nitrógeno líquido y homogenizadas con reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) como se reporta por Méndez et al (2011). La purificación de ARN fue eludida con 30 μl de agua destilada libre de RNAsas y almacenada -82°C. La concentración total de ARN fue determinada por un espectrofotómetro (Helios β , Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA) a 260 nm, y la pureza del ARN fue evaluado mediante el uso de la relación A260/A280, todos los ARN se mantuvieron en un rango de 1.8 a 2.0 (Sambrook y Rusell, 2001). La integridad del ARN total fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Todas las muestras tuvieron buena calidad de RNA con la relación 28S:18S ARNr alrededor de 2.0:1.1 (Sambrook and Russell, 2001).

4.3.5 Transcripción reversa y PCR cuantitativo

Aproximadamente 2 μg de ARN total fueron tratados con 1U de DNAsa I (1 U/ μl ; Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) y 6 μl de agua libre de nucleasas (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA); la reacción se realizó durante 15 min a temperatura ambiente y 15 min a 70°C para detener la reacción. La transcripción reversa fue iniciada con las muestras de ARN tratado con DNAsa, añadiendo 1 μl de random primers (150ng/ μl , Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y 1 μl de solución de dNTPs (10 μM cada uno); la reacción fue incubada por 5 min a temperatura de la sala y después fue colocado en hielo por 1 min. Se agregaron a la reacción 3 μl de agua libre de nucleasa, 1 μl de inhibidor ribonucleasa (40U/ μl ; Ribolock, Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) y 2 μl de buffer de transcripción reversa, la reacción se incubó a 42°C por 2 min para estabilizar antes de adicionar 1 μl de la enzima reversa transcriptasa (200 U/ μl ; RevertAid H Minus, Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). La reacción de transcripción reversa fue incubada a 42°C por 50 min, siguiendo con 15 min a 70°C, después se enfrió en hielo para detener la reacción.

Las muestras de ADNc fueron cuantificadas a través de un espectrofotómetro y diluidas en una concentración final de 50ng/μl.

Los primers específicos para b^{0,+}AT (SLC7A9), y⁺LAT1 (SLC7A7), B⁰AT1 (SLC6A19) y el 18S ARNr fueron diseñados acorde a sus secuencias publicadas en el GenBank (Cuadro 13). Un gen de referencia 18S ARNr (GenBank AY265350) fue usado como un control endógeno para normalizar la variación en ARNm. Antes de comenzar, se realizó un PCR cuantitativo para estandarizar las condiciones de amplificación para cada par de oligonucleótidos, con el fin de confirmar la especificidad de los productos de PCR relacionados con su ARNm. Una muestra de cada producto de PCR fue secuenciado en el centro de secuenciación de Davis (Davis, CA, USA). Los resultados de secuenciación revelaron que los productos para b^{0,+} AT, y⁺ LAT1, B⁰AT1 y 18S ARNr tuvieron 100% de homología con sus correspondientes secuencias esperadas adquiridas de las secuencias virtuales reportadas en el GenBank.

Cuadro 13. Oligonucleótidos para análisis de PCRq de ADNc derivado del ARNm de transportadores de AA b^{0,+}, y⁺L, B⁰ y ARNr 18S de cerdo.

ARNm	Iniciador	Loc. En el templado (pb)	Secuencia	Tamaño del amplicon (pb)
b^{0,+}: <i>Sus scrofa</i> Transportador de AA catiónicos b^{0,+} (SLC7A9, GenBank: EF127857)				
	Sentido	1-19	5'CGGAGAGAGGATGAGAAGT3'	562
	Antisentido	545-562	5'GCCCGCTGATGATGATGATGA3'	
y⁺ L: <i>Sus scrofa</i> Transportador de AA catiónicos y⁺ L (SLC7A7, GenBank: NM001110421.1)				
	Sentido	4239-4258	5'TCAAGTGGGGAACCCTGGTA3'	259
	Antisentido	4548-4567	5'ATGGAGAGGGGCAGATTCCT3'	
B⁰ : <i>Sus scrofa</i> Transportador de AA neutros B⁰ (SLC6A19, GenBank: DQ231579.1)				
	Sentido	8-28	5'TCTGTCCACAACAACCTGCGAG3'	205
	Antisentido	193-212	5'CAGCGAAGTTCTCCTGCGTC3'	
ARNr 18S : <i>Sus scrofa</i> ARNm ribosomal 18S (GenBank: AY265350)				
	Sentido	236-255	5'GGCCTCACTAAACCATCCAA3'	295
	Antisentido	511-530	5'TAGAGGGACAAGTGGCGTTC3'	

La expresión de genes (abundancia relativa de ARNm) que codifican para b^{0,+} AT, y⁺ LAT1, B⁰AT1 fueron estimados por ensayos de PCR cuantitativo (PCRq), utilizando SYBR Green/ROX PCRq Master Mix (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) y un termociclador Chromo 4-DNA Engine con el programa MJ Opticon Monitor 3.1 software (Bio-Rad, Herefordshire, England). El equipo fue calibrado con una curva estándar usando el 18S ARNr clonado dentro de un vector TOPO 4.0 a partir del cual se produjo un calibrador de ADNc. La curva estándar relativa para cada ARNm específico se obtuvo utilizando concentraciones conocidas de 5 diluciones seriadas de ADNc y el intervalo lineal para la cuantificación de ARNm fue

establecido. Las reacciones para qPCR contenían 50 ng de ADNc, 0.5µM de cada oligonucleótido específicos, 12.5 µl de mezcla maestra SYBR Green/ROX PCRq 2x, y se adicionó agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 25µl. Las condiciones de PCR que se usaron para la amplificación y cuantificación fueron: desnaturalización (95°C por 1min), 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 30s, alineación 56°C por 15 s, y extensión a 72 °C por 30 s) y de desnaturalización (60-90°C). La fluorescencia se midió al final de cada ciclo y cada 0.2°C durante el programa de desnaturalización. La abundancia relativa de ARNm se normalizo a la abundancia relativa de 18S mediante el cálculo del ARNm: 18S proporción de abundancia relativa (Liao et al., 2009).

4.3.6 Análisis de AA en las dietas y AA en suero

El análisis de AA fue llevado a cabo en el laboratorio de Evonik Industries AG, Hanau-Wolfgang, Alemania. La concentración de AA en las dietas se determinó por medio de cromatografía de intercambio iónico con detección postcolumna con ninhidrina, excepto Trp. Los AA se oxidaron con ácido per fórmico, que fue neutralizado con metabisulfito de sodio (Llames y Fontaine, 1994; Comisión Directive, 1998). La proteína de la dieta se hidrolizó con 6 N HCL por 24 h a 110°C y se cuantificó con el patrón interno mediante la medición de la absorción de productos de reacción con ninhidrina 570 nm. La concentración de suero de AA libres se determinó por medio de cromatografía de intercambio iónico utilizando un analizador en columna de litio Biochrom 20 (Biochrom, Cambridge, UK) y buffer de litio. La determinación de AA se realizó después de la disolución de las muestras de suero liofilizadas y se llevó a cabo la precipitación de proteínas con ácido sulfosalicílico y centrifugaron a 10000 rpm por 30 min a una temperatura 20-25°C). Los AA se cuantificaron con un estándar interno de norleucina para medir la absorción de reacción de productos con ninhidrina a 570 y 440 nm.

4.3.7 Análisis estadístico

El análisis de datos para todas las variables se realizó utilizando el programa SAS (Statistical Analysis System 9.1, SAS institute, Cary, NC, USA). El efecto de la dieta

y segmento intestinal (Experimento 1) sobre la actividad enzimática se analizó como un arreglo factorial 2 (APAA y BP) X 2 (Duodeno y Yeyuno); el efecto sobre la expresión de transportadores de AA se analizó con arreglo factorial 2 (BPAA y AP) X 3 (Duodeno, Yeyuno e íleon). Cuando la interacción dieta X segmento intestinal fuera significativa, se construyó un contraste no ortogonal para comparar el efecto de la dieta (BPAA vs. AP) entre cada uno de los segmentos intestinales. En adición, se construyeron 2 contrastes no ortogonales para comparar la expresión de transportadores de AA en yeyuno con el de duodeno (yeyuno vs. duodeno) e íleon (yeyuno vs. íleon). El efecto del tratamiento dietético sobre la CS de AA (Experimento 2) se analizó por muestras independientes *t*-test. Los niveles de probabilidad de $P \leq 0.05$ y $0.05 < P \leq 0.10$ fueron definidos como diferencias significativas y tendencias respectivamente.

4.5 RESULTADOS

Todos los cerdos completaron su experimento correspondiente. El consumo diario de alimento de cada cerdo fue de 890 y 800 g en el 1 y 2 respectivamente. Todos los cerdos consumieron sus comidas en 15 min o menos durante los 7 días de periodo de evaluación de respuesta.

4.5.1 Actividad enzimática

Las actividades de tripsina y quimotripsina se presentan en la Figura 4. La interacción dieta x segmento intestinal no fue significativa ($P > 0.05$). Los cerdos alimentados con la dieta AP tuvieron mayor actividad de tripsina y quimotripsina en la ingesta de duodeno y yeyuno ($P < 0.001$). Independientemente del tratamiento dietético, en promedio la actividad de tripsina fue mayor en yeyuno que en duodeno ($P < 0.05$). Sin embargo, el promedio de la actividad de quimotripsina no difirió entre la digesta duodenal y yeyunal ($P > 0.10$).

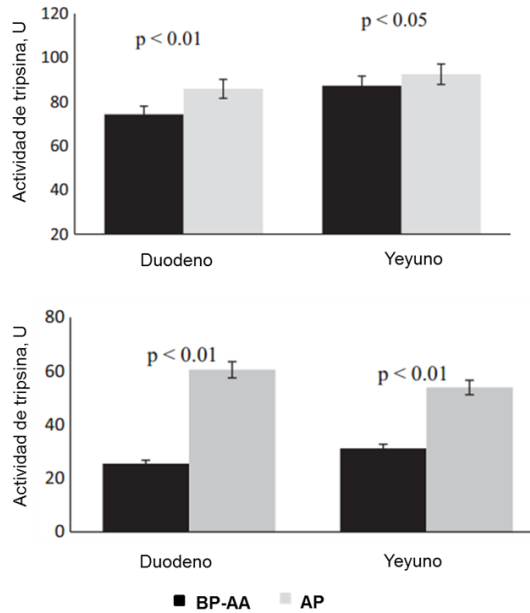


Figura 4. Actividad de tripsina y quimotripsina en duodeno y yeyuno de cerdos alimentados con la dieta BP suplementada con AA o la dieta AP. La interacción dieta X segmento intestinal no fue significativa ($P > 0.05$) para ambas enzimas.

4.5.2 Expresión de genes

Los valores de expresión relativa de ARNm que codifican para dos transportadores de AA catiónicos ($b^{0,+}AT$ y $y^{+}LAT1$) y uno de AA neutros ($B^{0}AT1$) en intestino delgado de cerdos se presenta en el cuadro 14. La interacción dieta x segmento intestinal fue significativa ($P < 0.05$) por lo tanto, el efecto de la dieta sobre la expresión de genes fue comparado por separado en cada uno de los segmentos intestinales. La expresión de ARNm para $b^{0,+}AT$ en duodeno fue mayor ($P = 0.030$) en cerdos alimentados con la dieta BPAA, pero no se observaron diferencias en yeyuno e íleon entre los cerdos alimentados con la BPAA y AP ($P > 0.10$). La expresión de ARNm para $y^{+}LAT1$ en duodeno tendió a ser mayor en cerdos alimentados con la dieta BPAA ($P = 0.098$) pero no se observaron diferencias en yeyuno ($P = 0.10$); no se observó expresión en íleon. La expresión de ARNm para $B^{0}AT1$ en duodeno y yeyuno no fue afectada por el tipo de dieta ($P > 0.10$) pero, fue mayor en íleon de cerdos alimentados con la dieta BPAA ($p = 0.011$).

Cuadro 14. Expresión de transportadores de AA en intestino delgado de cerdos en iniciación alimentados con la dieta BPAA o AP (Unidades arbitrarias, proporción de moléculas del ARNm: ARNr 18S).

Transportador	Segmento intestinal	Dieta *		EEM	P=
		BPAA	AP		
b ^{0,+} (SLC7A9)**	Duodeno	0.0649	0.0385	0.0071	0.030
	Yeyuno	0.0281	0.0295	0.0054	0.857
	Íleon	0.0139	0.0105	0.0019	0.236
y ⁺ LAT1(SLC7A7)	Duodeno	0.0154	0.0110	0.0019	0.098
	Yeyuno	0.0262	0.0334	0.0053	0.370
	Íleon	nd	nd	nd	nd***
B ⁰ AT1(SLC6A19)	Duodeno	0.0337	0.0333	0.0041	0.947
	Yeyuno	0.0374	0.0387	0.0081	0.913
	Íleon	0.0374	0.0091	0.0061	0.011

*Dietas: BPAA, Dieta a base de trigo-pasta de soya baja en PC (14%) suplementada con AA; AP, dieta base trigo-pasta de soya alta en PC sin suplementación de AA.

**Cerdos alimentados con la dieta BPAA: Duodeno vs. Yeyuno, P< 0.01

***Expresión de y⁺L no fue detectada en íleon.

La expresión comparativa de los transportadores de AA b^{0,+}AT y B⁰AT1 en duodeno, yeyuno e íleon se presenta en la Figura 5. En cerdos alimentados con la dieta BPAA, la expresión de ARNm para b^{0,+}AT en duodeno fue mayor que en el yeyuno (P< 0.01), no se observó diferencia entre yeyuno e íleon (P> 0.10). La expresión de ARNm para B⁰AT1 no fue diferente entre yeyuno y los otros dos segmentos intestinales (P> 0.10). En los cerdos alimentados con la dieta AP, la expresión de ambos transportadores b^{0,+}AT y B⁰AT1 en duodeno fue similar a la de yeyuno (P>0.10) pero fue mayor en yeyuno en comparación con íleon (P< 0.01).

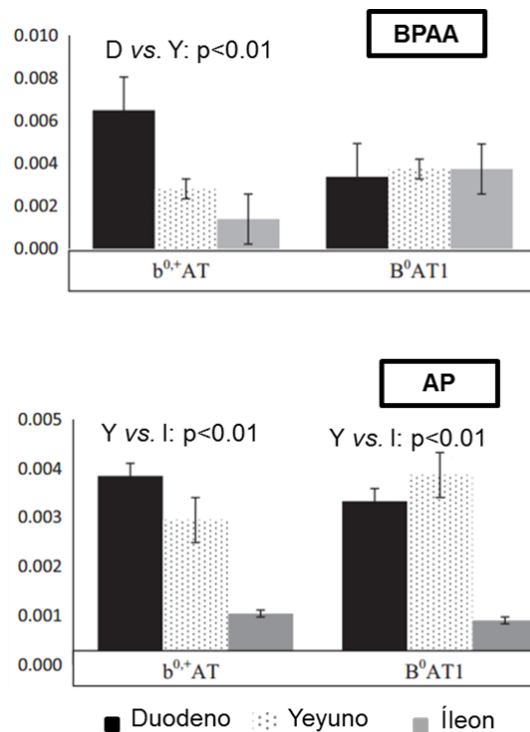


Figura 5. Expresión de transportadores de AA $b^{0,+}AT$ y B^0AT1 en duodeno (D), yeyuno (Y), e íleon (I) de cerdos alimentados con la dieta baja en proteína suplementada con AA libres (BPAA) y la dieta alta en proteína no suplementada con AA libres (AP) (Unidades arbitrarias, proporción de moléculas del ARNm: ARNr 18S). La interacción dieta x segmento intestinal fue significativa ($p < 0.05$) para ambos transportadores de AA.

4.5.3 Concentración sérica de aminoácidos

Las concentraciones séricas (CS) de AA esenciales y no esenciales libres en etapa absorbiva se presentan en el Cuadro 15. La concentración de Arg en suero fue mayor ($P = 0.011$) en cerdos alimentados con la dieta AP. En contraste, las concentraciones séricas de Lis ($P < 0.049$), Met ($P = 0.027$), y Tre ($P = 0.037$) fueron mayores en cerdos alimentados con la dieta BPAA. Las concentraciones séricas de His, Iso, Leu, Fen y Val no fueron afectadas por el tipo de dieta. Con respecto a los AA no esenciales, la concentración de Asn fue mayor ($P = 0.006$), Asp tendió a ser menor ($P = 0.094$) y Glu fue menor ($P = 0.003$) en cerdos alimentados con la dieta AP; no se encontraron diferencias en las CS de Ala, Asp, Gli y Pro ($p = 0.10$).

Cuadro 15. Concentración post-prandial de AA libres (mg/100mL) en cerdos en iniciación alimentados con la dieta BPAA o AP.

Aminoácido	BPAA	AP	EEM	Valor de <i>P</i>
AA esenciales				
Arg	2.258	4.300	0.454	0.011
His	1.244	1.688	0.205	0.141
Iso	1.992	2.318	0.326	0.487
Leu	3.344	2.878	0.537	0.546
Lis	4.147	1.954	0.747	0.049
Met	1.173	0.631	0.162	0.027
Fen	1.614	1.998	0.233	0.257
Tre	4.336	2.295	0.649	0.037
Val	3.318	2.775	0.510	0.533
AA no esenciales				
Ala	7.920	6.445	0.910	0.264
Asn	0.944	1.688	0.173	0.006
Asp	0.269	0.195	0.030	0.094
Gln	8.574	7.448	0.987	0.439
Glu	3.198	1.465	0.366	0.003
Gli	5.818	5.816	0.664	0.999
Pro	4.401	4.786	0.530	0.616
Ser	1.508	1.892	0.236	0.263

4.6 DISCUSIÓN

Este estudio se realizó para determinar si la alimentación de cerdos jóvenes con dietas bajas en proteína suplementadas con AA libres afecta sus funciones digestivas y de absorción en comparación con los alimentados con una dieta alta en proteínas sin AA libres. Los AA Lis, Met y Tre libres en la dieta BPAA representaron aproximadamente el 53%, 50% y 36%, respectivamente, del contenido total de cada AA.

Por tanto, cantidades sustanciales de estos AA fueron fácilmente disponibles para la absorción cuando llegaron al intestino delgado proximal, sin la necesidad de enzimas proteolíticas. Sin embargo, la dieta AP que contenía solo AA unidos a proteína necesitaba ser digerida por la acción de proteasas pancreáticas. Por lo tanto, nosotros especulamos que la abundancia o actividad de proteasas pancreáticas y transportadores de AA pueden ser diferentes entre todos los cerdos alimentados con la dieta AP o la BPAA.

Al parecer, la secreción de proteasas pancreáticas es afectada por la presencia de enzimas pancreáticas y sus substratos en el intestino delgado proximal. La infusión de tripsina activa, quimotripsina o elastasa en duodeno bloquea la secreción de jugo pancreático (Ihse *et al.*, 1979), pero sus zimógenos son incapaces de suprimirlo (Lyman *et al.*, 1974). En contraste, la infusión de inhibidor de tripsina estimula la secreción de proteasas pancreáticas (Miura *et al.*, 1997). Al parecer las proteasas pancreáticas activas son críticas en la regulación de la secreción pancreática. Fushiki e Iwai (1989) reportaron que la secreción de enzimas pancreáticas en ratas y cerdos es regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa mediado por la actividad intestinal de tripsina y quimotripsina. Por otra parte, la infusión intestinal de proteína intacta (caseína), pero no una mezcla de AA libres semejante a la composición de AA de la caseína, estimulo la secreción pancreática en ratas (Schneeman *et al.*, 1997). La baja actividad de tripsina y quimotripsina analizada en digesta de duodeno y yeyuno de los cerdos alimentados con la dieta BPAA en el presente experimento está de acuerdo con estos reportes. La dieta BPAA contenía menos proteína, y esta proteína contenía menos Lis y Arg (aprox. 50%) que la dieta

AP debido a su menor porcentaje de proteína de soya. Tripsina es altamente específica para Lis y Arg (Olsen *et al.*, 2004). Por lo tanto, se especula que el alto contenido de Arg y Lis ricos en dietas AP atrajo más tripsina evitando la inhibición de secreción pancreática. Liddle *et al.*, (1986) reportaron que la proteína de la dieta, altamente susceptible a la actividad de proteasas pancreáticas, estimula la secreción de enzimas pancreáticas, al servir como inhibidores transitorios de la tripsina. Por lo tanto, el contenido bajo de proteína, Arg y Lis parcialmente explica la reducción en la actividad de tripsina y quimotripsina en cerdos alimentados con la dieta BPAA.

La liberación y absorción de la mayoría de las proteínas unidas AA ocurre principalmente en el yeyuno (Silk *et al.*, 1985). En consecuencia, se espera que la abundancia de transportadores de AA en cerdos alimentados con dietas que contienen AA unidos a proteína sea mayor en mucosa de yeyuno que en la de duodeno e íleon. Así mismo, el alto contenido de Lis libre e la dieta BPAA utilizada en el presente experimento podría estimular la abundancia de los transportadores de Lis en duodeno, en comparación con los cerdos alimentados con la dieta AP. Basándose en reportes previos (Dave *et al.*, 2004; Broër, 2008), la expresión (abundancia de ARNm) de transportadores de AA asemeja su actividad funcional, por lo tanto el incremento en la expresión de transportadores de Lis en duodeno puede mejorar la capacidad de absorción de cerdos alimentados con la dieta BPAA. Nuestro interés particular por los transportadores de Lis, es porque este es el primer AA limitante en la mayoría de las dietas para cerdos; además, nos interesa el transportador de AA neutros, ya que Leu interactúa con Lis para su absorción.

La absorción de Lis en la dieta por el enterocito en intestino delgado de los cerdos se ve facilitada en gran medida por el transportador de AA $b^{0,+}AT$ (Bröer, 2008), que se expresa principalmente en la membrana apical de células epiteliales (Torras-Llort *et al.*, 2001). La expresión de $b^{0,+}AT$ ha sido reportada en duodeno, yeyuno e íleon de cerdos Tibetanos (Wang *et al.*, 2009) y cerdos en crecimiento (Morales *et al.*, 2015a). Los sistemas $b^{0,+}AT$ tienen función antiporte ya que intercambian Leu por Lis, llevando Lis hacia adentro del enterocito e intercambiar Leu que sale al lumen

intestinal (Pineda *et al.*, 2004). En el presente experimento, la expresión de $b^{0,+}AT$ en duodeno fue aproximadamente dos veces mayor en los cerdos alimentados con la dieta BP en comparación con los alimentados con la dieta AP. Una respuesta similar fue reportada recientemente usando cerdos de 25-50 kg (Morales *et al.*, 2015a). Interesantemente, la expresión de $b^{0,+}AT$ en yeyuno no fue afectada por el tratamiento dietético, teniendo resultados similares a los de Zhang *et al.*, (2013) y Morales *et al.*, (2015b). Por tanto, los resultados del presente experimento indican que la presencia libre de Lis en digesta duodenal estimula la expresión de $b^{0,+}AT$ en la mucosa de duodeno. Además, asumiendo que la expresión de transportadores de AA representa su actividad funcional (Dave *et al.*, 2004; Bröer, 2008), estos resultados pueden indicar que: a) la absorción duodenal de Lis libre en la dieta puede ser mayor que cuando Lis está unida a proteína, y b) la eficiencia de absorción de AA puede ser mayor en cerdos alimentados con la dieta BPAA.

El transporte de Lis desde el lumen intestinal a sangre, iniciando por $b^{0,+}AT$, es completado por el sistema y^+LAT1 que transporta Lis a través de la membrana basolateral del enterocito a la sangre (Bröer, 2008). Este sistema también funciona como antiporte, transportando Lis del enterocito hacia sangre a cambio de Leu que ingresa al enterocito (Pfeiffer *et al.*, 1999). In el presente experimento, la expresión de y^+LAT1 en duodeno tendió a ser 50% mayor en cerdos alimentados con la dieta BPAA. Similar a $b^{0,+}AT$ la expresión de y^+LAT1 en yeyuno no fue afectada por el tipo de dieta. Nuevamente, asumiendo que la expresión de transportadores de AA corresponde con actividad funcional, estos resultados pueden indicar una actividad complementaria entre y^+LAT1 y $b^{0,+}AT$ en el proceso de traer AA catiónicos del lumen intestinal a la circulación sanguínea. Por otra parte, los cerdos alimentados con la dieta BPAA tendieron a expresar más y^+LAT1 en yeyuno que en duodeno (datos no mostrados). Estos resultados soportan la hipótesis de que la forma (libre vs. unidos a proteína) en que los AA están incluidos en la dieta afecta el sitio de expresión de y^+LAT1 en cerdos en crecimiento. Esta respuesta diferencial puede ser explicado como resultado de diferencias en la disponibilidad de AA para la absorción, ej. en la dieta con AA libres los AA son fácilmente disponibles, mientras

que los AA unidos a proteína tiene que ser digeridos liberados de las proteínas de la dieta.

La absorción de AA neutros en el intestino delgado es mediada por el sistema B⁰AT1 (Bröer, 2008), que se localiza exclusivamente en la membrana apical del enterocito y transporta todos los AA neutros con mayor preferencia por Leu, Ile, Val y Met (Reimer *et al.*, 2000). Zhang *et al.*, (2013) reportaron que la suplementación de AA de cadena ramificada no afectó la expresión de B⁰AT1 en yeyuno. Nosotros observamos recientemente que la expresión de B⁰AT1 en duodeno, yeyuno e íleon no fue diferente entre cerdos en crecimiento (25-50 kg) alimentados con una dieta baja en proteína suplementada con AA libres o una dieta alta en proteína no suplementada con AA (Morales *et al.*, 2015b). La expresión de B⁰AT1 analizada en duodeno y yeyuno del presente estudio no fue afectada por el tipo de dieta, pero era 4.1 veces mayor en íleon de cerdos alimentados con la dieta BPAA. Aunque la dieta BPAA se suplemento con AA neutros libre, contenía más del 80 % de AA unidos a proteínas, esto nos puede explicar la falta de efecto en duodeno y yeyuno. Sin embargo, no está muy claro por qué la expresión de B⁰AT1 en íleon fue mayor en cerdos alimentados con la dieta BPAA. La dieta BPAA fue formulada mayormente con trigo (aprox. 86%), comparada con la dieta AP, que contenía 51% de trigo y 41% de pasta de soya. En consecuencia, se puede especular que la proteína del trigo contiene aproximadamente 50% de AA neutros y son preferentemente digeridos en la parte distal del intestino delgado. Asumiendo que el flujo normal de Leu al enterocito ocurre a través de la membrana apical y basolateral a través de B⁰AT1 y y⁺LAT1 respectivamente (Bröer, 2008), se esperaría un contenido intracelular de AA neutros adecuado, lo que a su vez ayuda a sostener la absorción intestinal de AA catiónicos a través de b^{0,+}AT.

El transportador B⁰AT1 se expresa de forma similar en todos los segmentos (duodeno, yeyuno e íleon) de intestino de ratones (Romeo *et al.*, 2006) mientras que en humanos, la expresión de B⁰AT1 se incrementa de duodeno e íleon (Terada *et al.*, 2005). En cerdos de 25-50 kg, la expresión de B⁰AT1 en yeyuno fue sustancialmente mayor que en los otros dos segmentos intestinales (Morales *et al.*,

2015b). En el presente estudio, la expresión de B⁰AT1 no fue diferente entre los segmentos intestinales de cerdos alimentados con la dieta BPAA, pero en cerdos alimentados con la dieta AP fue mayor en ambos duodeno y yeyuno comparado con íleon (Fig. 4). Estos datos indican diferentes patrones de expresión entre especies y peso corporal de cerdos.

Se espera que la abundancia intestinal de transportadores de AA esté correlacionada con la absorción y disponibilidad de los AA preferidos por estos transportadores. El contenido de AA en la dieta (Langer y Fuller, 2000) y la forma (libre vs. unido a proteína) en el que los AA son consumidos por los cerdos (Yen *et al.*, 2004) se reflejan en la concentración sérica de AA libre cuando se colecta la muestra sanguínea en las 3 primeras horas post-prandial. Los contenidos totales de Lis, Met y Tre en el presente estudio fueron similares entre la dieta BPAA y AP, pero la dieta BPAA contenía cantidades sustanciales de Lis, Tre y Met mientras que la dieta AP contenía AA exclusivamente unidos a proteína. Esto explica por qué las concentraciones de Lis, Tre y Met fueron entre 90% y 110% mayores en los cerdos alimentados con la dieta BPAA. Curiosamente, la concentración sérica más alta de Lis corresponde a la mayor expresión de b^{0,+}AT en duodeno de los mismos cerdos. Por otra parte, el valor más alto de suero en Arg en cerdos alimentados con la dieta AP es explicada parcialmente por el hecho de que esta dieta contenía casi el doble de Arg en comparación de la dieta BPAA. Por tanto, la concentración sérica de AA en el presente experimento indica que a la concentración sérica de AA refleja su composición en la dieta, así como la forma (libre vs. unida a proteína) en el que los AA son consumidos, y b) la concentración AA en suero puede reflejar la abundancia diferencial y la actividad de los transportadores de AA, localizados en cada segmento del intestino.

4.7 CONCLUSIÓN

En conclusión, las actividades de tripsina y quimotripsina en cerdos de 17 kg son afectadas por el contenido de proteína en la dieta. Por lo tanto, adicionar AA libres a dietas bajas en proteína modifica diferencialmente el patrón de expresión de los transportadores de AA $b^{0,+}AT$, $y^{+}LAT1$ y $B^{0}AT1$ en el intestino delgado e incrementan a los primeros dos duodeno y al tercero en íleon. La presencia de lisina libre en duodeno incrementa la abundancia (expresión) de ARNm que codifica para la síntesis de transportadores de AA catiónicos $b^{0,+}AT$ y $y^{+}LAT1$. El incremento de la concentración sérica de Lis en cerdos alimentados con la dieta BPAA, la cual fue adicionada con niveles significativamente altos de Lis libre, parece apoyar la hipótesis de que la expresión de los transportadores de AA semeja su actividad funcional. Basándonos sobre esta hipótesis, parece que los cerdos alimentados con dietas bajas en proteína y suplementadas con niveles altos de AA libres, realizan ciertos ajustes fisiológicos para modificar su patrón de absorción. Específicamente, la mayor abundancia de transportadores de AA catiónicos en duodeno combinado con el incremento de concentración sérica de AA catiónicos en cerdos alimentados con una dieta BPAA, puede sugerir un incremento de la capacidad de absorción de estos cerdos, a pesar de su reducida actividad enzimática.

5. CONCLUSIÓN GENERAL

La utilización de dietas bajas en proteína suplementadas con AA libres puede ser una alternativa para sistemas de producción porcina. De acuerdo con los resultados obtenidos en estos experimentos nos muestran que cuando se administra una dieta AP o BPAA puede modificar la actividad de tripsina y quimotripsina en los diferentes segmentos intestinales teniendo una mayor modificación en yeyuno, recordando que yeyuno es el segundo segmento de intestino delgado, y que morfológicamente tiene mayor tamaño en cerdos, por lo tanto se lleva a cabo mayor absorción de AA, aunado a esto incrementa la expresión de diferentes transportadores de AA. Una manera que puede ser útil para observar una mayor absorción en intestino delgado fue encontrar los tres primeros AA limitantes en cerdos en las concentraciones séricas, esto nos indica que al formular una dieta que cubra el 100% de los requerimientos de AA, hay una absorción y aprovechamiento de estos AA de acuerdo con las necesidades del animal, esto se va a reflejar en el comportamiento productivo del animal.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akridge, J. T.; Brorsen, B. W.; Whipker, L. D.; Forrest, J. C.; Kuei, C. H.; Schinckel, A. P.; 1992: Evaluation of alternative techniques to determine pork carcass value. *J Anim. Sci.* 70: 18-28.
- Anthony, J. C.; Anthony, T. G.; Kimball, S. R.; Jefferson, L.S.; 2001: Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr.*; 131:856S–860S.
- AOAC. 2006: Official methods of analysis. 18th ed. AOAC Int., Arlington, VA.
- ARC.1981: The nutrient requirements of pigs. Slough, England: Commonwealth Agricultural Bureaux
- Batterham, E. S. and Murison R. D. 1981. Utilization of free lysine by growing pigs. *Br. Journal nutrition*, 46, 87.
- Batterham, E. S.; Murison, R. D. Lowe, R. F.; 1981: Availability of lysine in vegetable protein concentrates as determined by the slope-ratio assay with growing pigs and rats and by chemical techniques. *Br. J. Nutr.* 45: 401.
- Bautista, N.; Cervantes, M.; Cuca, M.; Pro, A.; Torrentera, N.; 2002: Digestibilidad ileal aparente de aminoácidos en dietas de sorgo-pasta de soya con diferentes niveles de proteína para cerdos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 36, No. 4, 2002.
- Beck, I.T., 1973: The role of pancreatic enzymes in digestion. *Am J Clin Nutr.* 26(3): pp. 311–25.
- Bergen, W.G.; Wu, G. 2009: Intestinal nitrogen recycling and utilization in health and disease. *J Nutr*, 139:821–825.
- Bertran, J.; Werner, A.; Chillaron, J.; Nunes, V.; Biber, J.; Testar, X., Zorzano A, Estivill X, Murer H, Palacin M. 1993. Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 268: 14842–14849.
- Bikker, P., M. W. A. Verstegen, B. Kemp, and M. W. Bosch. 1996a. Performance and body composition of finishing gilts (45 to 85 kilograms) as affected by energy intake and nutrition in earlier life. I. Growth of the body and body components. *J. Anim. Sci.* 74:806–816.

- Bikker, P., M. W. A. Verstegen, B. Kemp, and M. W. Bosch. 1996b. Performance and body composition of finishing gilts (45 to 85 kilograms) as affected by energy intake and nutrition in earlier life. II. Protein and lipid accretion in body components. *J. Anim. Sci.* 74:817–826.
- Bröer, A. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88:249–286. doi:10.1152/physrev.00018.2006.
- Bröer, A., K. Klingel, S. Kowalczyk, J. E. Rasko, J. Cavanaugh, and S. Broer. 2004. Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J. Biol. Chem.* 279:24467–24476. doi:10.1074/jbc.M400904200.
- Carter, S. D., G. L. Cromwell, M. D. Lindemann, L. W. Turner, and T. C. Bridges. 1996. Reducing N and P excretion by dietary manipulation in growing and finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 74(Suppl. 1):59 (Abstr.).
- Commission Directive. 1998. Establishing community methods for 434 the determination of amino acids, crude oils and fats, and olan-quindox in feeding stuff and amending Directive 71/393/EEC, annex part A, Determination of amino acids. *Offc. J.* L257:14–23.
- Commission Directive. 2000. Establishing community methods for the determination of vitamin A, vitamin E and tryptophan, annex part C. Determination of tryptophan. *Offc. J.* L174:45–50.
- Coudenys, K. T. 1998. The effect of body weight and energy intake on the physical and chemical body composition in growing finishing pigs. M.S. Thesis, Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, ON, Canada.
- Dave, M.H., Schulz, N., Zecevic, M., Wagner, C.A., Verrey, F., 2004. Expression of heteromeric amino acid transporters along the murine intestine. *J. Physiol.* 558, 597-610.
- Davey, R. J., and B. Bereskin. 1978. Genetic and nutritional effects on carcass chemical composition and organ weights of market swine. *J. Anim. Sci.* 46:992-1000.
- De Blas, C., G. G. Mateos, y P. G. Rebollar. 1999. Normas FEDNA para la formulación de piensos compuestos. Ed. Pancosma, Madrid, España. pp: 41-44.

- de Greef, K. H., M. W. A. Verstegen, B. Kemp, and P. van der Togt. 1994. The effect of body weight and energy intake on the composition of deposited tissue in pigs. *Anim. Prod.* 58:263– 270.
- de Lange, C. F. M., S. H. Birkett and P. C. H. Morel. 2001. Protein, fat and bone tissue growth in swine. Pages 65–84 in *Swine Nutrition*. A. Lewis and L. Southern, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Directive, Commission, 1998: Establishing community methods for the determination of amino acids, crude oils and fats, and aflatoxin in feeding stuff and amending Directive 71/393/EEC, annex part A. Determination of Amino Acids. *Official Journal L257*, 14–23.
- Eggert, J. M., Depreux, F. F. S., Schinckel, A. P., Grant, A. L., & Gerrard, D. E. (2002). Myosin heavy chain isoforms account for variation in pork quality. *Meat Science*, 61, 117–126.
- El Idrissi A (2008) Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. *Amino Acids* 34:321–328
- Fushiki, T.; Iwai, K., 1989: Two hypotheses on the feedback regulation of S pancreatic enzyme secretion. *The FASEB Journal* 3, 121–126. Green, G. M.; Levan, V. H.; Liddle, R. A., 1986: Plasma cholecystokinin and pancreatic growth during adaptation to dietary protein. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 251, G70–G74.
- García-Launay, F., H. M. G. Van der Weff, T. T. H. Nguyen, L. Le Tutour and J. Y. Dourmad. 2014. Evaluation of the environmental implications of the incorporation of free-use amino acids in pig production using life cycle assessment. *Livest. Sci.* 161:158-175. doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.027.
- García-Villalobos, H., A. Morales-Trejo, B. A. Araiza-Piña, J. K. Htoo, and M. Cervantes-Ramírez. 2012. Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 66:257–270. doi:10.1080/1745039X.2012.697351.
- Gloaguen M, N. Le Floc'h, L. Brossard, R. Barea, Y. Primot, E. Corrent and J. van Milgen. 2011. Response of piglets to the valine content in diet in combination with the supply of other branched-chain amino acids. *Animal* 5, 1734-1742

- Gloaguen M, N. Le Floc'h, Y. Primot, E. Corrent and J. van Milgen. 2012. Providing a diet deficient in valine but with excess leucine results in a rapid decrease in feed intake and modifies the postprandial plasma amino acid and α -keto acid concentrations in pigs. *J. Anim. Sci.* 90, 3115-3142.
- Gloaguen, M., N. L. Floc'h, E. Corrent, Y. Primot, and J. V. Milgen. 2014. The use of free amino acids allows formulating very low crude protein diets for piglets. *J. Anim. Sci.* 92:637-644. Doi:10.2527/jas.2013-6514.
- Goodman, B. E. 2010. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Am. J. Physiol.-Adv. Physiol. Edu.* 34:44–53. doi.org/10.1152/advan.00094.2009.
- Graham L. 1980. Nutrient absorption in pigs. *Journal science food agricultural.* 31, 1087-1130
- Gu, Y., A. P. Schinckel, and T. G. Martin. 1992. Growth, development, and carcass composition in five genotypes of swine. *J. Anim. Sci.* 70:1719-1729.
- Guay, F., S. M. Donovan, and N. L. Trottier. 2006. Biochemical and morphological developments are partially impaired in intestinal mucosa from growing pigs fed reduced-protein diets supplemented with crystalline amino acids. *J. Anim. Sci.* 84:1749–1760. doi:10.2527/jas.2005-558.
- Hammelman, J. E., Bowker, B. C., Grant, A. L., Forrest, J. C., Schinckel, A. P., & Gerrard, D. E. (2003). Early postmortem electrical stimulation simulates PSE pork development. *Meat Science*, 63, 69–77
- Hara, H., Ohyama, S. & Hira, T. 2000. Luminal dietary protein, not amino acids, induces pancreatic protease via CCK in pancreaticobiliary rats. *Anim. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)* 278: 937
- Hatzoglou, M., J. Fernandez, I. Yaman, and E. Closs. 2004. Regulation of cationic amino acid transport: The story of the CAT-1 transporter. *Annu. Rev. Nutr.* 24:377–399. doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073120.
- He, L., H. Yang, Y. Hou, T. Li, J. Fang, X. Zhou, Y. Yin, L. Wu, M. Nyachoti and G. Wu. 2013. Effects of dietary L-Lisine intake on the intestinal mucosa and expression of CAT genes in weaned piglets. *Amino Acids* 45:383-391. doi:10.1007/s00726- 013-1514-0.

- Hee, J.; Sauer, W. C.; Mosenthin, R.; 1988: The measurement of pancreatic secretions in the pig with the pouch technique. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 60:241
- Henckel, P., Karlsson, A., Oksbjerg, N., & Petersen, J. S. (2000). Control of post mortem pH decrease in pig muscles: Experimental design and testing of animal models. *Meat Science*, Ozawa, S., Mitsuhashi, T., Mitsumoto, M., Matsumoto, S., Itoh, N., Itagaki, K., et al. (2000). The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese black steers. *Meat Science*, 54, 65–70. 55, 131–138.
- Hummel, B. C. W., 1959: A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 1393–1399.
- Hutson, S. M. 2006. The case for regulating indispensable amino acid metabolism: the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase-knockout mouse. *Biochem J.* 400:e1–e3. [PubMed: 17061958]
- Ihse, I.; Lilja, P.; Lundquist, I., 1979: Trypsin as a regulator of pancreatic secretion in the rat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 14, 873–880.
- Infante, J. L. Z, Cahu, C. L. 2007: Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture* 268:98–105
- Jobgen, W. S., Fried S. K., 2006: Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* 17:571–588Kepka-Lenhart et al. 2000.
- Jorgensen, H. and Just, A. 1988: Effect of different dietary components on site of absorption/site of disappearance of nutrients. *Proc. 4th. Symp. On “Digestive physiology in the pig”*. Jablonna, 230-239.
- Kaji, I, Akiba Y, Kaunitz JD 2013: DIGESTIVE PHYSIOLOGY OF THE PIG SYMPOSIUM: involvement of gut chemosensing in the regulation of mucosal barrier function and defense mechanisms. *J Anim Sci* 91:1957 1962
- Kanai, Y.; Fukasawa, Y.; Cha, S, H.; Segawa, H.; Chairoungdua, A.; Kim, D. K.; Matsuo, H.; Kim, J. Y.; Miyamoto, K.; Takeda, E.; Endou, H.; 2000: Transport

- properties of a system y⁺L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J Biol Chem* 275: 20787–20793
- Karlsson, A. H., Klont, R. E., Fernandez, X. 1999: Skeletal muscle fibers as factors for pork quality. *Livestock Production Science*, 60, 255–269
- Katz, R. S., D. H. Baker, C. E. Sasse, A. H. Jensen and B. G. Harmon. 1973: Efficacy of supplemental lysine, methionine and rolled oats for weanling pigs fed a low-protein corn-soybean meal diet. *Journal of animal science*, vol. 37, no. 5.
- Kendall, D. C., R. W. Fent, J. L. Usry, and G. L. Allee. 2004: The essentiality of nonessential amino acids in low protein diet formulations for 11 to 30 kg barrows. *J. Anim. Sci.* 82(Suppl. 2):125 (Abstr.). Kerr, B. J., and R. A. Easter. 1995. Effect of feeding reduced protein, amino acid-supplemented diets on nitrogen and energy balance in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 73:3000–3008.
- Kerr, B. J., L. L. Southern, T. D. Bidner, K. G. Friesen, and R. A. Easter. 2003: Influence of dietary protein level, amino acid supplementation, and dietary energy levels on growing-finishing pig performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 81:3075–3087.
- Langer, S., and M. F. Fuller. 2000: Interactions among the branched chain amino acids and their effects on methionine utilization in growing pigs: Effects on nitrogen retention and amino acid utilization. *Br. J. Nutr.* 83:49–58. doi:10.1017/S0007114500000088.
- Le Bellego, L., J. van Milgen, and J. Noblet. 2002: Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 80:691–701.
- Lewis, A. J. 2001: Amino acids in swine nutrition. In Lewis A, Southern JL (Eds.) *Swine Nutrition*. 2nd ed. CRC Press. New york, USA. Pp. 151-186
- Liao, S. F., E. S. Vanzant, D. L. Harmon, K. R. McLeod, J. A. Boiling, and J. C. Matheus. 2009: Ruminal and abomasal starch hydrolysate infusions selectively decrease the expression of cationic amino acid transporter mRNA by small intestinal epithelia of forage-fed beef steer. *J. Dairy Sci.* 92:1124–1135. doi:10.3168/jds.2008-1521.
- Liddle, A. R., Green, G. M., Conrad, C. K.; Williams, J.A. 1988: Proteins but not amino acids, carbohydrates, or fats stimulate cholecystokinin secretion in the rat. *Am. J. Physiol.* 14:243

- Liddle, R. A.; Green, G. M.; Conrad, C. K.; Williams, J. A., 1986: Proteins but not amino acids, carbohydrates or fats stimulate cholecystokinin secretion in rats. *American Journal of Physiology* 251, G243–G248.
- Lin, F. D., D. A. Knabe, and T. D. Tanksley Jr. 1987: Apparent digestibility of amino acids, gross energy and starch in corn, sorghum, wheat, barley, oat groats and wheat middlings for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 64:1655–1663.
- Llames, C. R., and J. Fontaine. 1994: Determination of amino acids in feeds: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 77:1362–1402.
- Lupi, A.; Tenni, R.; Rossi, A.; 2008: Human prolidase and prolidase deficiency. *Amino Acids* 35:739–752
- Lyman, R. L.; Olds, B. A.; Green, G. M., 1974: Chymotrypsin in the intestine of rats fed soybean trypsin inhibitor and its inability to suppress pancreatic enzyme secretions. *Journal of Nutrition* 104, 105–110.
- Majumder, M., I. Yaman, F. Gaccioli, V. V. Zeenko, C. Wang, M. G. Caprara, R. C. Venema, A. A. Komar, M. D. Snider, and M. Hatzoglou. 2009: The hnRNA-binding proteins hnRNP L and PTB are required for efficient translation of the Cat-1 arginine/lysine transporter mRNA during amino acid starvation. *Mol. Cell. Biol.* 29:2899–2912. doi:10.1128/MCB.01774-08.
- Mc Meekan, C. P. 1940. Growth and development in the pig, with special reference to carcass quality characteristics. *J. Agr. Sci.* 30:276–289
- Mendez, V.; Avelar, E.; Morales, A.; Cervantes, M.; Araiza, A.; Gonzalez, D., 2011: A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genetics and Molecular Research* 10, 3251–3255.
- Mitchell, H. H.; 1964: Comparative nutrition of man and domestic animals. New York: Academic Press
- Miura, Y.; Murayama, H.; Tsuzuki, S.; Sugimoto, E.; Torii, K.; Fushiki, T., 1997: Long-term consumption of an amino acid diet reduces the pancreatic enzyme secretion response to a trypsin inhibitor in rats. *Journal of Nutrition* 127, 1377–1381.
- Morales, A., M. A. Barrera, B. A. Araiza, R. T. Zijlstra, H. Bernal, and M. Cervantes. 2013: Effect of excess levels of lysine and leucine in wheat-based, amino acid-fortified diets on the mRNA expression of two selected cationic amino acid transporters in pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97:263–270. doi:10.1111/j.1439-0396.2011.01266.x.

- Morales, A.; Buenabad, L.; Castillo, G.; Arce, N.; Araiza, B. A.; Htoo, J. K.; Cervantes, M., 2015a: Low protein amino acid supplemented diets for growing pigs: effect on expression of amino acid transporters, serum concentration, performance and carcass composition. *Journal of Animal Science* 93, 2154–2164.
- Morales, A.; García, H.; Arce, N.; Cota, M.; Zijlstra, R. T.; Araiza, B. A.; Cervantes, M., 2015b: Effect of L-lysine on expression of selected genes, serum concentration of amino acids, muscle growth and performance of growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99, 701–709.
- Kennelly P. J.; Rodwell V. W. *Enzimas: mecanismo de acción*. Editores: Murray, R. K.; Bender, D. A.; Botham K. M.; Kennelly P. J.; Rodwell V. W.; Weil P. A. Harper. *Bioquímica ilustrada*. 28 ed. 2009. Capítulo 7.
- Navarro-Guillen, C.; Moyano, F. J.; Yufera, M.; 2015: Diel food intake and digestive enzyme production patterns in *Solea senegalensis* larvae. *Aquaculture* 435:33–42
- Nieto, R., L. Lara, M. A. García, M. A. Vílchez, and J. F. Aguilera. 2003: Effects of dietary protein content and food intake on carcass characteristics and organ weights of growing Iberian pigs. *Anim. Sci.* 77:47–56. Noblet, J., H. Fortune, H. S. Shi, and S. Dubois. 1994. Prediction of net energy value of feeds for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 72:344–354.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO- 1999). 2001: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. In: Ochoa M. L. I (ed.), *Diario Oficial de la Federación*. Norma Oficial Mexicana, México (DF), México, pp. 1–58.
- Novelli, A.; Tasker, R. A. R.; 2008: Excitatory amino acids in epilepsy: from the clinics to the laboratory. *Amino Acids* 32:295–297
- NRC. 2012: *Nutrient requirements of swine*. 12th ed. Natl. Acad. Press, Washington
- Olsen, J. V.; Ong, S.E.; Mann, M., 2004: Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics* 3, 608–614.
- Orlando, G. F.; Wolf, G.; Engelmann, M.; 2008: Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice. *Amino Acids* 35:17–27
- Orlando, U. A. D.; de Oliveira, R. F. M.; Donzele, J. L.; Silva, F. C. D.; Generoso, R. A. R.; de Siqueira, J. C. 2007: Dietary crude protein levels and amino acid

supplementation for gilts from 30 to 60 kg maintained in a high environmental temperature. *Rev Bras Zootecn* 36:1573–1578

Palacín, M. 2001. The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:328–335. doi.org/10.1016/S0959 437X(00)00198-2

Pérez-Jimenez, A.; Cardenete, G.; Morales, A. E.; Garcia-Alcazar, A.; Abellan, E.; Hidalgo, M. C.; 2009: Digestive enzymatic profile of Dentex dentex and response to different dietary formulations. *Comp Biochem Phys A* 154:157–164

Pfeiffer, R., G. Rossier, B. Spindler, C. Meier, L. Kuhn, and F. Verrey. 1999: Amino acid transport of y₋-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.* 18:49–57. doi:10.1093/emboj/18.1.49.

Phang, J. M, Donald SP, Pandhare J, Liu Y.; 2008: The metabolism of proline, as a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino Acids* 35:681–690

Pineda, M., C. A. Wagner, A. Broer, P. A. Stehberger, S. Kaltenbach, J. L. Gelpi, R. Martin Del Rio, A. Zorzano, A. Palacin, A. Lang, and S. Broer. 2004: Cystinuria-specific rBAT (R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBATb_{0,+AT}. *Biochem. J.* 377:665–674. doi:10.1042/BJ20030956.

Portejoie, S, Dourmad JY, Martinez J, Lebreton Y.; 2004: Effect of lowering dietary crude protein on nitrogen excretion, manure composition and ammonia emission from fattening pigs. *Livest Prod Sci* 91:45–55

Preston, R. L.; Schaeffer, J. F.; Curran, P. F. 1974: Structure-affinity relationships of substrates for the neutral amino acid transport system in rabbit ileum. *J Gen Physiol* 64: 443– 467.

Quintero, M. A. 1995. Use of enzymes in swine nutrition. *Revista científica, FCV-LUZ/ Vol. V, No. 2, 125-129.*

Ratliff, B. W., A. M. Gaines, P. Srichana, G. L. Allee, and J. L. Usry. 2005: Evaluation of high synthetic amino acid inclusion and supplemental arginine in starter diets. *J. Anim. Sci.* 83(Suppl. 2):69.

Rees, R. G. P., J. J. P. James, G. K. Grimble, D. Halliday, P. G. Frost, and D. B. A. Silk. 1992: Glycine nitrogen in total parenteral nutrition: Two prospective

- clinical trials comparing the efficacy of high and low glycine containing amino acid solutions. *Gut* 33:848–856. doi:10.1136/gut.33.6.848.
- Reimer, R. J., F. A. Chaudhry, A. T. Gray, and R. H. Edwards. 2000: Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7715–7720. doi:10.1073/pnas.140152797.
- Rerat, A., C. Simous-Nunes, F. Mendy, P. Vaissade, and P. Vaugelade. 1992: Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the non-anaesthetized pig. *Br. J. Nutr.* 68:111–138. doi:10.1079/BJN19920071.
- Richmond, R. J., and R. T. Berg. 1971a: Tissue development in swine as influenced by liveweight, breed, sex and ration. *Can. J. Anim. Sci.* 51:31–40.
- Richmond, R. J., and R. T. Berg. 1971b: Muscle growth and distribution in swine as influenced by liveweight, breed, sex and ration. *Can. J. Anim. Sci.* 51:41–48.
- Rinderknecht, H., 1986: Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci*, 31(3): pp. 314–21.10.1007/BF01318124
- Romeo, E., M. H. Dave, D. Bacic, Z. Ristic, S. M. Camargo, J. Loffng, C. A. Wagner, and F. Verrey. 2006: Luminal kidney and intestine SLC6 amino acid transporters of B0AT-cluster and their tissue distribution in *Mus musculus*. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290:F376–F383. doi:10.1152/ajprenal.00286.2005.
- Ryu, Y.; C.; Kim, B. C.; 2005: The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig longissimus dorsi muscle. *Meat Science*, 71, 351–357.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001: *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Schaart, M. W., H. Schierbeek, S. R. D. van der Schoor, B. Stoll, D. G. Burrin, P. J. Reeds, and J. B. van Goudoever. 2005: Threonine utilization is high in the intestine of piglets. *J. Nutr.* 135:765–770.

- Scheele, G., Bartelt, D., and Bieger, W., 1981: Characterization of human exocrine pancreatic proteins by two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Gastroenterology*. 80(3): pp. 461–73.
- Schneeman, B. O.; Chang, I.; Smith, L. B.; Lyman, L., 1977: Effect of dietary amino acids, casein, and soybean trypsin inhibitor on pancreatic protein secretion in rats. *Journal of Nutrition* 107, 281–288.
- Schultz, S. G., Curran P. F. 1970: Coupled transport of sodium and organic solutes. *Physiol Rev* 50: 637–718.
- Silk, D. B., G. K. Grimble, and R. G. Rees. 1985: Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proc. Nutr. Soc.* 44:63–72. doi:10.1079/PNS19850011.
- Silk, D. B.; Grimble, G. K.; Rees, R. G., 1985: Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proceedings of the Nutrition Society* 44, 63–72.
- Stahly, T. S., and G. L. Cromwell. 1979: Effect of environmental temperature and dietary fat supplementation on the performance and carcass characteristics of growing and finishing swine. *J. Anim. Sci.* 49:1478-1488
- Stein, H. H., S. W. Kim, T. T. Nielsen, and R. A. Easter. 2001: Standardized ileal protein and amino acid digestibility by growing pigs and sows. *J. Anim. Sci.* 79:2113–2122.
- Suenaga, R.; Tomonaga, S.; Yamane, H.; 2008: Intracerebroventricular injection of L-arginine induces sedative and hypnotic effects under an acute stress in neonatal chicks. *Amino Acids* 35:139–146
- Sutton, A. L; Mathew, A. G.; Scheidt, A. B.; Patterson, J. A. and Kelley, G. T. 1992: Effects of carbohydrate sources and organic acids on intestinal microflora and performance of the weaning pig. *Proc. 5th Symposium o Digestive Physiology in the pig.* Wageningen, 422-427.
- Tate, S. S.; Yan N., Udenfriend S., 1992: Expression cloning of a N⁺- independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc Natl Acad. Sci USA* 89: 1–5.
- Terada, T., Y. Shimada, X. Pan, K. Kishimoto, T. Sakurai, R. Doi, H. Onodera, T. Katsura, M. Imamura, and K. Inui. 2005: Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human

digestive tract. *Biochem. Pharmacol.* 70:1756–1763.
doi:10.1016/j.bcp.2005.09.027.

- Tess, M. W., G. E. Dickerson, J. A. Nienaber, and C. L. Ferrell. 1986: Growth, development and body composition in three genetic stocks of swine. *J. Anim. Sci.* 62:968-979
- Torras-Llort, M., D. Torrents, J. F. Soriano-García, J. L. Gelpí, R. Estévez, M. Palacín, and M. Moretó. 2001: Sequential amino acid exchange across b₀,+ like system in chicken brush border jejunum. *J. Membr. Biol.* 180:213–222. doi:10.1007/s002320010072.
- Torrents, D., Estevez, R., Pineda, M., Fernandez, E., Lloberas, J., Shi, Y. B., Zorzano, A. and Palacin, M.; 1998: Identification and characterization of a membrane protein (y+L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y+L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Biol. Chem.* **273**, 32437–32445.
- Trujillo-Coutiño, J. E., Figueroa-Velasco, J. L. Martínez-Aispuro, M. Zamora-Zamora V., Cordero-Mora, J. L. Sánchez-Torres, M. T. Cuca-García, M. y Cervantes-Ramírez, M.; 2007: Concentración de urea en plasma y respuesta productiva de cerdos en iniciación alimentados con dietas sorgo-pasta de soya bajas en proteína. *Agrociencia* 41: 597-607
- Tuitoek, J. K.; Young, L. G.; de Lange, C. F. M. and Kerr. B. J. 1997: The effect of reducing excess dietary amino acids on growing-finishing pig performance: An evaluation of the ideal protein concept. *J. Anim. Sci.* 75:1575–1583.
- Wagner, J. R., A. P. Schinckel, W. Chen, J. C. Forrest, and B. L. Coe. 1999: Analysis of body composition changes of swine during growth and development. *J. Anim. Sci.* 1999. 77:1442–1466
- Wang, W., W. Gu, X. Tang, M. Geng, M. Fanc, T. Li, W. Chu, C. Shi, R. Huang, H. Zhang, and Y. Yin. 2009: Molecular cloning, tissue distribution and ontogenetic expression of the amino acid transporter b_(0,+) cDNA in the small intestine of Tibetan suckling piglets. *Comp. Biochem. Physiol. B* 154:157–164. doi:10.1016/j.cbpb.2009.05.014
- Wek, C. 1992: Enzymes in the nutrition of growing pigs. In *Pork Talk 2000*. Vol. 3. Pp22-36. Profiting in tough Times.
- Wells, R. G.; Hediger, M. A.; 1992: Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5596–5600

- Whittemore, C. T. 1993. *The Science and Practice of Pig Production*. Longman Group UK, Essex, England
- Whitcomb, D.C., and Lowe, M.E., 2007: Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci*, 52(1): pp. 1–17. [10.1007/s10620-006-9589-z](https://doi.org/10.1007/s10620-006-9589-z)
- Willis, A.; Beander, H. U.; Steel, G.; Valle, D.; 2008: PRODH variants and risk for schizophrenia. *Amino Acids* 35:673–679
- Windahl, M. S., C. R. Petersen, H.E. Christensen, P. Harris. 2008: Crystal structure of tryptophan hydroxylase with bound amino acid substrate. *Biochemistry* 46:12087-94.
- Wu, G.; Bazer, F. W.; Cudd, T. A.; 2004a: Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr* 134:2169–2172
- Wu, G, Fang, Y.Z, Yang, S.; 2004b: Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134:489–492
- Wu, G.; Knabe, D. A.; Kim, S. W.; 2004c: Arginine nutrition in neonatal pigs. *J Nutr* 134:2783S–2790S
- Wu, G, Bazer, F. W, Davis, T. A.; 2007a: Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livest Sci* 112:8–22
- Wu, G.; 2009: Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37:1–17. 4.
- Wu, G.; 2013a: *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition*. CRC Press, Boca Raton, Florida}
- Wu, G, Bazer F. W.; Dai, Z. L.; Li D. F, Wang, J. J.; Wu, Z. L.; 2014c: Amino acid nutrition in animals: Protein synthesis and beyond. *Annu Rev Anim Biosci* 2:387–417
- Wu, L., L-Q. He, Z-J. Cui, G. Liu, K. Yao, F. Wu, J. Li, and T-J. Li. 2015: Effects of reducing dietary protein on the expression of nutrition sensing genes (amino acid transporters) in weaned piglets. *J. Zhejiang University-SCIENCE B*, 16:496–502. doi.org/10.1631/jzus.B1400259.
- Yen, J. T. 1997: Oxygen consumption and energy flux of porcine splanchnic tissues. In: J. P. Laplace, C. Fevrier, and A. Barbeau, editors, *Digestive physiology in pigs: Proc. 7th Int. Symp. Digest. Physiol. Pigs*. EAAP Publ. No. 88. Inst. Natl. Rech. Agron. Saint Malo, France. p. 260–269.

- Yen, J. T., B. J. Kerr, R. A. Easter, and A. M. Parkhurst. 2004. Difference in rates of net portal absorption between crystalline and protein-bound lysine and threonine in growing pigs fed once daily. *J. Anim. Sci.* 82:1079–1090.
- Yi, X. W., S. Zhang, Q. Yang, H. Yin, and S. Y. Qiao. 2010. Influence of dietary net energy content on performance of growing pigs fed low crude protein diets supplemented with crystalline amino acids. *J. Swine Health Prod.* 18:294–300.
- Yue, L. Y., and S. Y. Qiao. 2008. Effects of low-protein diets supplemented with crystalline amino acids on performance and intestinal development in piglets over the first 2 weeks after weaning. *Livest. Sci.* 115:144–152. doi:10.1016/j.livsci.2007.06.018.
- Zhang, S., S. Qiao, M. Ren, X. Zeng, X. Ma, Z. Wu, P. Thacker, and G. Wu. 2013. Supplementation with branched-chain amino acids to a low-protein diet regulates intestinal expression of amino acid and peptide transporters in weanling pigs. *Amino Acids* 45:1191–1205. Doi:10.1007/s00726-013-1577