

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**



**“Digestibilidad de energía y aminoácidos de pasta de canola en cerdos; comportamiento productivo y expresión de transportadores de aminoácidos en cerdos alimentados con dietas suplementadas con aminoácidos libres”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA:**

**FERNANDO GRAGEOLA NÚÑEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. MIGUEL CERVANTES RAMÍREZ**

*Mexicali, Baja California Marzo 2013*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado

Al instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, por darme la oportunidad de formar parte de esta prestigiosa institución.

Al Dr. Miguel Cervantes Ramírez, por su apoyo en la dirección y asesoría del presente trabajo de investigación y por sus enseñanzas al compartir sus conocimientos y ser parte fundamental en el proceso de mi formación doctoral.

A la Dra. Adriana Morales Trejo, por su constante apoyo en el laboratorio de biología molecular y su aporte de conocimientos y sugerencias que enriquecieron mi permanencia durante mis estudios doctorales.

Al Dr. Benedicto Alfonso Araiza Piña, por el gran apoyo brindado durante mis estudios de posgrado, además por sus aportaciones y sugerencias en el desarrollo de mi tesis doctoral.

Al Dr. Adolfo Pérez Márquez, por la revisión y sus oportunos comentarios y sugerencias en la realización del presente estudio.

Al Dr. Jorge Luis Yáñez Hernández, por sus comentarios y sugerencias aportados en este trabajo de investigación.

Al Dr. Ruurd T. Zijlstra, por su apoyo y confianza brindada durante mi estancia de investigación en la Universidad de Alberta, Canadá.

A todos mis amigos y compañeros del Cuerpo Académico de Nutrición Animal (CANA), por su valiosa colaboración en equipo, con entusiasmo y calidad.

## DEDICATORIA

*A Dios por iluminarme en este camino lleno de alegrías, logros y momentos difíciles, pero siempre dándome la fuerza y perseverancia para alcanzar mis metas*

*A mis padres y hermanos que son parte fundamental en todo este proceso, siendo mi fortaleza y admiración.*

La presente tesis titulada “**DIGESTIBILIDAD DE ENERGÍA Y AMINOÁCIDOS DE PASTA DE CANOLA EN CERDOS; COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EN CERDOS ALIMENTADOS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON AMINOÁCIDOS LIBRES**”, realizada por C. **Fernando Grageola Núñez**; bajo la dirección del **Dr. Miguel Cervantes Ramírez**, siendo aceptada, revisada y aprobada, por el Consejo Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**Consejo Particular**

DIRECTOR DE TESIS \_\_\_\_\_

DR. MIGUEL CERVANTES RAMÍREZ

SINODAL \_\_\_\_\_

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

SINODAL \_\_\_\_\_

DR. BENEDICTO ALFONSO ARAIZA PIÑA

SINODAL \_\_\_\_\_

DR. ADOLFO PÉREZ MÁRQUEZ

SINODAL \_\_\_\_\_

DR. JORGE LUIS YAÑEZ HERNÁNDEZ

POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE

|   |        |
|---|--------|
| AGRADECIMIENTOS .....   | I      |
| DEDICATORIA.....  | II     |
| ÍNDICE DE CUADROS .....   | VI     |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | VII    |
| LISTA DE ABREVIACIONES .....  | VIII   |
| Introducción General .....  | - 1 -  |
| I. Digestibilidad de energía y aminoácidos de pasta de canola extraída por presión en frío y extraída por presión con vapor en cerdos en finalización canulados en íleon terminal.....                            | - 4 -  |
| 1.1. Resumen.....   | - 4 -  |
| 1.2. Abstract.....  | - 5 -  |
| 1.3. Introducción.....  | - 6 -  |
| 1.4. Materiales y métodos .....   | - 8 -  |
| 1.4.1 <i>Diseño experimental y dietas</i> .....   | - 8 -  |
| 1.4.2. <i>Procedimiento experimental</i> .....  | - 11 - |
| 1.4.3. <i>Análisis químico</i> .....  | - 12 - |
| 1.4.4. <i>Cálculos</i> .....  | - 13 - |
| 1.4.5. <i>Análisis estadístico</i> .....  | - 14 - |
| 1.5. Resultados .....   | - 15 - |
| 1.6. Discusión .....  | - 21 - |
| 1.7. Conclusiones.....  | - 26 - |
| 1.8. Literatura citada .....  | - 28 - |
| II. Comportamiento productivo y expresión de proteínas transportadoras de aminoácidos catiónicos en cerdos alimentados con dietas altas en proteína o bajas en proteína suplementadas con aminoácidos libres..... | - 34 - |
| 2.1. Resumen.....   | - 34 - |

|  |        |
|--|--------|
| 2.2. Abstract.....   | - 35 - |
| 2.3. Introducción.....   | - 36 - |
| 2.4. Materiales y métodos .....  | - 39 - |
| 2.4.1. <i>Animales y alojamiento</i> .....                                 | - 39 - |
| 2.4.2. <i>Dietas</i> .....   | - 39 - |
| 2.4.3. <i>Colección de tejidos</i> .....                                   | 43     |
| 2.4.4. <i>Extracción de ARN y transcripción reversa</i> .....              | 43     |
| 2.4.4.1. <i>Extracción total de ARN y purificación</i> .....               | 43     |
| 2.4.5. <i>Transcripción reversa</i> .....                                  | 44     |
| 2.4.6. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativo</i> ..... | 44     |
| 2.4.7. <i>Análisis estadístico</i> .....                                   | 47     |
| 2.5. Resultados .....  | 48     |
| 2.6. Discusión .....   | 51     |
| 2.7. Conclusiones.....   | 56     |
| 2.8. Literatura citada .....   | 58     |
| III. Conclusiones generales .....  | 62     |

## ÍNDICE DE CUADROS

**Cuadro 1.1** Composición de ingredientes y análisis del contenido de nutrientes (g por kg) de las dietas experimentales (Exp.1).

**Cuadro 1.2** Análisis del contenido de nutrientes (g por kg) de pasta de canola extraída por presión en frío (PCEF) y pasta de canola extraída por presión con vapor (PCEV) incluidas en las dietas experimentales (Base MS; Exp.1).

**Cuadro 1.3** Digestibilidad ileal aparente (DIA) y digestibilidad aparente en el tracto aparente (DATT) de energía y DIA de aminoácidos de dietas (Exp.1).

**Cuadro 1.4** Digestibilidad ileal aparente (DIA) y digestibilidad aparente en el total tracto (DATT) de energía y digestibilidad ileal estandarizada (DIE) de AA de los ingredientes de prueba (Exp.1).

**Cuadro 1.5** Energía Digestible (ED), energía neta (EN) y contenido de aminoácidos ileal digestibles estandarizados (CADE) de los ingredientes de prueba (base MS; Exp.1).

**Cuadro 2.1** Formulación de las dietas experimentales baja en proteína suplementada con AA y alta en proteína (Exp.2).

**Cuadro 2.2** Análisis del contenido de proteína cruda y aminoácidos en las dietas experimentales y los requerimientos para cerdos en crecimiento, porcentaje (Exp.2).

**Cuadro 2.3** Oligonucleótidos usados para el análisis de PCR cuantitativo de ADNc derivado del ARNm del transportador de aminoácidos catiónicos  $b^{0,+}$  y miosina, y el ARN ribosomal 18S (Exp.2).

**Cuadro 2.4** Rendimiento de cerdos alimentados con dietas base trigo, baja en proteína suplementada con aminoácidos (BP-AA) o alta en proteína (AP; Exp.2).

**Cuadro 2.5** Características de la canal de cerdos alimentados con dietas a base de trigo, baja en proteína suplementada con aminoácidos (BP-AA) o alta en proteína (AP; Exp.2).

**Cuadro 2.6** Expresión de  $b^{0,+}$  en dos segmentos del intestino delgado (yeyuno e ileon), hígado, músculo *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus*, y miosina en estos músculos de cerdos alimentados con una dieta baja en proteína suplementada con Lys, Thr y Met libres (BP-AA) o alta en proteína (AP; Exp.2).

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Cambios en la expresión de  $b^{0,+}$  y CAT-1 en íleon comparado con yeyuno de cerdos alimentados con dietas baja en proteína suplementada con aminoácidos (BP-AA) o alta en proteína (AP; Exp.2).

## LISTA DE ABREVIACIONES

**AA.-** Aminoácidos

**ADNc.-** Acido desoxirribonucleico complementario

**AP.-** Alta en proteína

**ARN.-** Ácido ribonucleico

**ARNm.-** Ácido ribonucleico mensajero

**ARNr.-** Ácido ribonucleico ribosomal

**b<sup>0,+</sup>.**- Transportador de aminoácidos catiónicos independiente de sodio

**BP-AA.-** Baja en proteína suplementada con aminoácidos cristalinos

**Ca.-** Calcio

**CADE.-** Contenido de aminoácidos digestibles estandarizados

**CAT-1.-** Transportador de aminoácidos catiónicos-1

**CDA.-** Consumo diario de alimento

**DATT.-** Digestibilidad aparente en el tracto total

**DEPC.-** Dietilpirocarbonato

**DIA.-** Digestibilidad ileal aparente

**DIE.-** Digestibilidad ileal estandarizada

**dNTPs.-** desoxirribonucleótidos trifosfato

**EB.-** Energía bruta

**ED.-** Energía digestible

**EE.-** Error estándar

**EEM.-** Error estándar de la media

**EM.-** Energía metabolizable

**EN.-** Energía neta

**FAD.-** Fibra ácido detergente

**FDN.-** Fibra detergente neutro

**GDP.-** Ganancia diaria de peso

**HCl.-** Ácido clorhídrico

**K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-**Carbonato de potasio

**MgO.-** Oxido de magnesio

**MLD.-** Músculo *Longissimus dorsi*

**MS.-** Materia seca

**MST.-** Músculo *Semitendinosus*

**Na.-** Sodio

**P.-** Fosforo

**pb.-** pares de bases

**PC.-** Proteína cruda

**PCEF.-** Pasta de canola extraída por presión en frio

**PCEV.-** Pasta de canola extraída por presión con vapor

**PCR.-** Reacción en cadena de la polimerasa

**PCRc.-** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo

**TiO<sub>2</sub>-** Oxido de titanio

## **Introducción General**

En el sistema de producción de ganado porcino, la alimentación representa hasta un 80% del costo total. En años recientes, los costos incrementaron en parte por el crecimiento exponencial en la utilización de fuentes energéticas renovables para la producción de biodiesel; esto provocó un aumento anticipado en el precio de ingredientes tradicionalmente empleados en la formulación de dietas para cerdos. Estas dietas típicamente se componen utilizando la combinación (cereales-pasta de soya), las cuales son formuladas con la cantidad adecuada de proteína cruda según los requerimientos nutrimentales para el máximo crecimiento por etapa productiva (NRC, 1998), y para cubrir las necesidades del primer aminoácido limitante (lisina). Sin embargo, debido al número reducido de ingredientes y al desequilibrio que se produce por la composición de aminoácidos (AA) de esos ingredientes, se provoca un exceso en el contenido de todos los demás AA en la dieta. (Cervantes et al., 2009; Lewis, 2001). Por consiguiente, es necesario buscar alternativas de alimentación ó el uso de ingredientes alimenticios alternativos que ayuden a reducir los costos por alimentación y lograr mayor eficiencia en la producción porcina.

Actualmente una opción que puede contribuir a disminuir los costos de alimentación es la pasta de canola, éste es un subproducto de la industria de la extracción del aceite de semilla de canola. Este subproducto se considera como una fuente de proteína de alta calidad, además, de su aporte energético por su contenido de aceite residual, considerado de alto valor nutricional en comparación con otros ingredientes típicos utilizados en la alimentación porcina con el mismo

precio. En este sentido, Seneviratne et al. (2010), indican que en cerdos destetados la pasta de canola puede reemplazar parcialmente a pasta de soya hasta un nivel de inclusión de 150 g de pasta de canola por kg de alimento sin afectar la ganancia de peso; no obstante el consumo de alimento se redujo. En otro estudio, la inclusión de 200 g de pasta de canola por kg alimento en sustitución de pasta de soya no redujo el comportamiento productivo de cerdos destetados (Landeró et al., 2011). Sin embargo, existe información muy limitada sobre el uso de pasta de canola en comportamiento productivo de cerdos en etapa de finalización.

Otra estrategia en la nutrición de cerdos, consiste en formular dietas bajas en proteína adicionadas con aminoácidos libres, de esta forma se mejora el balance de AA en la dieta y en consecuencia, disminuye la excreción de nitrógeno y se mantiene una respuesta similar en el comportamiento productivo al compararla con dietas típicas ó proteína intacta. Existe evidencia que indica, que una reducción entre el 3 y 4 % en la concentración de proteína cruda de la dieta para cerdos en crecimiento, no afecta el rendimiento productivo si se suministran AA indispensables para cubrir las necesidades alimenticias (Hansen et al., 1993; Kerr et al., 1995; López et al., 1994). Sin embargo Guay y Trottier (2006), reportaron que existen diferentes tasas de absorción de AA, asociado con el nivel de inclusión de AA cristalinos a las dietas bajas en proteína en comparación con AA provenientes de la proteína intacta, lo cual, pudiera contribuir a una reducción de la utilización de AA por el organismo, particularmente por el tejido muscular.

La utilización de otras fuentes alternativas de alimentación, como formular dietas bajas en proteína cruda (11.1%) suplementadas con aminoácidos libres (lisina, treonina y metionina), ó utilizar pasta de canola (500 g/kg de alimento) como fuente de proteína, sugieren disminuir la inclusión de ingredientes típicos en la formulación de dietas. Sin embargo, se desconoce cómo estas alternativas de alimentación podrían afectar la digestibilidad de aminoácidos y energía, así como, su absorción y utilización, y por consiguiente, la expresión de proteínas transportadoras de aminoácidos en cerdos en crecimiento y finalización.

## **I. Digestibilidad de energía y aminoácidos de pasta de canola extraída por presión en frío y extraída por presión con vapor en cerdos en finalización canulados en íleon terminal**

### **1.1. Resumen**

La digestibilidad de la energía y aminoácidos de pasta de canola extraída por presión en frío y extraída por presión con vapor fueron evaluadas en seis cerdos castrados (peso inicial promedio  $65.7 \pm 1.7$  kg) equipados con una cánula tipo "T" simple en el íleon distal. Los cerdos fueron alimentados dos veces al día a un nivel de 2.8 veces el requerimiento de energía digestible, con dietas conteniendo 500 g por kg de pasta de canola extraída por presión en frío (PCEF) o pasta de canola extraída por presión con vapor (PCEV) y una dieta libre de nitrógeno bajo la estructura de un diseño experimental con arreglo en cuadro latino ortogonalmente replicado 3 x 3. La digestibilidad aparente en el tracto total (DATT) y la digestibilidad ileal aparente (DIA) de energía, contenido de energía digestible (ED), la DIA de lisina y cisteína, fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en la dieta PCEF que en PCEV. En los ingredientes, DATT y DIA de energía y el contenido de ED fueron superiores ( $P < 0.05$ ) en PCEF que en PCEV. La DIA de los AA de PCEF fue mayor para lisina y cisteína ( $P < 0.05$ ). La digestibilidad ileal estandarizada (DIE) de PCEF fue superior para cisteína, isoleucina, lisina y valina comparada con PCEV. El contenido de energía neta (EN) fue mayor ( $P < 0.001$ ) en PCEF que en PCEV. Sin embargo, el contenido de todos los AA DIE de PCEV fue mayor ( $P < 0.05$ ) comparada con PCEF. La calidad nutricional de las pastas de canola extraída por presión en frío y extraída por presión con vapor varía con las condiciones de procesamiento; además el mayor contenido de aceite residual en PCEF

incrementó los valores de ED y EN. El contenido de grasa y de fibra cruda fueron factores importantes en el incremento de DIE de AA en PCEF, no obstante, de su menor contenido de proteína, comparada con PCEV. El alto nivel de glucosinolatos en PCEF puede limitar el nivel de inclusión en dietas para cerdos en finalización.

Palabras claves: energía, aminoácido, extraída por presión en frío, extraída por presión con vapor, pasta de canola, digestibilidad.

### **1.2. Abstract**

The energy and amino acid digestibility of cold-pressed (CP) canola cake and expeller-pressed (EP) canola meal were evaluated using six crossbred Hypor barrows (initial BW of  $65.7 \pm 1.7$  kg) fitted with a simple T-cannula at the distal ileum. Pigs were fed twice daily at 2.8 times the estimated maintenance requirement of digestible energy. Diets containing 500 g/kg of either CP canola cake or EP canola meal and an N-Free diet were tested in a replicated 3 × 3 Latin square. Total glucosinolate content of CP canola cake was about 50% lower than that in EP canola meal (5.6 vs 11.9  $\mu\text{mol/g}$ ). The apparent total tract digestibility and apparent ileal digestibility (AID) of energy were greater ( $P < 0.05$ ) in CP canola cake than EP canola meal. The digestible energy content ( $P < 0.05$ ) and the calculated net energy content (11.9 vs. 10.1 MJ/kg of DM) were higher ( $P < 0.001$ ) in CP canola cake compared to EP canola meal. The oil content in CP canola cake was 2 times higher than that in EP canola meal. The AID of lysine and cysteine was greater in CP canola cake than EP canola meal ( $P < 0.05$ ). The standardized ileal digestibility (SID) of cysteine, isoleucine, lysine and valine was higher ( $P < 0.05$ )

in CP canola cake compared to EP canola meal. However, the SID content of all AA was greater ( $P < 0.05$ ) in EP canola meal compared to cold-pressed canola cake. In conclusion, the nutritional quality of CP canola cake and EP canola meal varied with processing conditions; in addition, greater residual oil in CP canola cake increased the DE and NE values. Therefore, fat content and crude fibre were determinants of greater SID of AA in CP canola cake, despite its lower protein content, compared with EP canola meal. The higher glucosinolate level of EP canola meal could limit the level of inclusion for finishing pig diets.

Key words: energy, amino acid, cold-pressed, expeller-pressed, canola meal, digestibility

### **1.3. Introducción**

La pasta de canola es un subproducto que se está utilizando en el oeste de Canadá en la alimentación animal, particularmente para animales no rumiantes (Bell et al., 2000), que se obtiene después de la extracción de aceite de la semilla de canola. El aceite de canola puede ser extraído usando diferentes métodos en función de la tecnología utilizada en las plantas extractoras. Pasta de canola extraída por presión en frío (PCEF) y pasta de canola extraída por presión con vapor (PCEV) contienen mayor contenido de aceite residual que la pasta extraída con solventes, como resultado de diferentes eficiencias en el método de extracción de aceite (Spragg y Mailer, 2007). El contenido de aceite en pasta de canola extraída con solventes es 2-3%, mientras PCEV contiene aproximadamente 12% y PCEF puede contener más de un 20% (Beltranena y Zijlstra, 2011). Glencross et al. (2004), demostraron que el método de extracción se relacionó con el contenido

de proteína, grasa y energía; mencionando que en pasta de canola extraída con solventes, comparada con PCEV, el nivel de proteína cruda fue mayor (432 vs 381 g por kg de MS, respectivamente); no obstante, con menor contenido de grasa cruda (30 vs 136 g por kg de MS, respectivamente). Seneviratne et al. (2011), publicaron que PCEV contenía 7% menos proteína cruda y 15% menos extracto etéreo que PCEF.

Pasta de canola extraída por presión con vapor, es un subproducto que provee adecuada energía y aminoácidos (Seneviratne et al., 2010; Spragg y Mailer, 2007; Canola Council of Canada, 2009; Woyengo et al., 2010a) estimando que el costo por MJ de EN de aceite residual es menor que otros suplementos energéticos como aceite de canola, sebo o grasas de tipo vegetal o animal (Beltranena y Zijlstra, 2011).

Pasta de canola extraída por presión en frío, es un subproducto de la industria del biodiesel que puede ser además una atractiva fuente de proteína y energía para incluirla en la formulación de dietas para cerdos. (Seneviratne et al., 2011; van Barneveld, 2008; Leming y Lember, 2005). Sin embargo, la calidad nutricional y el contenido de factores antinutricionales en PCEF y PCEV pueden variar ampliamente debido a diversas tecnologías de prensado y condiciones particulares que se utilizan en plantas de aceite o en una región en particular (Beltratena y Zijlstra, 2011; Seneviratne et al., 2011). La información relacionada con el uso de estos subproductos en la alimentación de cerdos en finalización es limitada. Esto sugiere, evaluar el efecto del procesamiento sobre la calidad y

características nutricionales de PCEF y PCEV para utilizarlo como alimento en cerdos en finalización y mejorar el uso de estos subproductos en la producción porcina.

La hipótesis en el presente estudio fue que PCEF y PCEV son buenas fuentes de aminoácidos y energía para cerdos, no obstante, su composición de nutrientes y digestibilidad difieren. Los objetivos fueron determinar digestibilidad aparente en el tracto total (DATT), digestibilidad ileal aparente (DIA), de energía bruta y aminoácidos, digestibilidad ileal estandarizada (DIE) y contenido de aminoácidos digestibles estandarizados (CADE) de PCEF y PCEV.

#### **1.4. Materiales y métodos**

Los procedimientos con los animales para el estudio fueron aprobados por la Comisión de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Alberta, siguiendo los principios establecidos por Canadian Council on Animal Care (CCAC, 2009).

##### *1.4.1 Diseño experimental y dietas*

La información sobre el valor nutritivo de los subproductos de canola se analizó bajo la estructura de un diseño experimental en un cuadro latino ortogonalmente replicado 3 x 3 usando 3 dietas (Cuadro 1.1), se tomaron 6 observaciones por dieta. En el presente estudio se probaron dos subproductos de pasta de canola: una procesada con presión en frío (Cansource Biofuels, Mayerthorpe, Alberta, Canada; PCEF) y otra procesada con presión con vapor (Hartland Colony, Bashaw, Alberta, Canada; PCEV). Ambos productos de pasta

de canola se mezclaron con almidón de maíz para preparar las dietas de prueba que contenían 50% de los ingredientes de prueba. Se utilizó una dieta libre de nitrógeno con base en almidón, para estimar la pérdida de aminoácidos endógenos basales (Stein et al., 2006). Las dietas se fortificaron con una premezcla de vitaminas y minerales para cubrir los requerimientos (NRC, 1998), e incluyeron óxido de titanio como marcador indigestible.

**Cuadro 1.1.** Composición de ingredientes y análisis del contenido de nutrientes (g por kg) de las dietas experimentales.

|   | N-Libre | Pasta de canola presión-frío <sup>a</sup> | Pasta de canola presión-vapor <sup>b</sup> |
|---|---------|---|--|
| <b>Ingrediente</b>                                      |         |   |  |
| Almidón de maíz   | 780.0   | 400.1                                     | 400.1                                      |
| Pasta de canola extraída por presión-frío <sup>a</sup>  | -       | 500.0                                     | -  |
| Pasta de canola extraída por presión-vapor <sup>b</sup> | -       | -   | 500.0                                      |
| Celulosa, dextrosa                                      | 100.0   | 51.7                                      | 51.7                                       |
| Solka floc  | 40.0    | -   | -  |
| Aceite de canola  | 30.0    | 15.2                                      | 15.2                                       |
| Piedra caliza   | 9.0     | 4.0                                       | 4.0  |
| Fosfato mono-dicálcico                                  | 17.0    | 10.0                                      | 10.0                                       |
| Sal   | 4.0     | 4.0                                       | 4.0  |
| Premezcla de vitaminas <sup>c</sup>                     | 5.0     | 5.0                                       | 5.0  |
| Premezcla de minerales <sup>d</sup>                     | 5.0     | 5.0                                       | 5.0  |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 56%K                     | 4.0     | -   | -  |
| MgO 58%Mg   | 1.0     | -   | -  |
| TiO <sub>2</sub>  | 5.0     | 5.0                                       | 5.0  |
| <b>Análisis de composición</b>                          |         |   |  |
| Humedad   | 100.3   | 106.6                                     | 96.7                                       |
| Proteína cruda  | 13.40   | 150.6                                     | 176.7                                      |
| Grasa cruda   | 26.1    | 136.0                                     | 76.4                                       |
| Fibra cruda   | 15.3    | 31.3                                      | 43.9                                       |
| Cenizas   | 35.4    | 46.3                                      | 52.3                                       |
| Energía bruta (MJ/kg)                                   | 17.0    | 20.5                                      | 19.4                                       |
| <b>Aminoácidos esenciales</b>                           |         |   |  |
| Arginina  | 0.1     | 9.0                                       | 10.9                                       |
| Histidina   | 0.1     | 3.8                                       | 4.7  |
| Isoleucina  | 0.3     | 6.2                                       | 7.4  |
| Leucina   | 0.6     | 10.6                                      | 13.0                                       |
| Lisina  | 0.3     | 8.8                                       | 10.5                                       |
| Metionina   | 0.1     | 2.6                                       | 3.2  |
| Fenilalanina  | 0.3     | 6.2                                       | 7.3  |
| Treonina  | 0.7     | 6.3                                       | 7.8  |
| Triptófano  | 0.4     | 1.9                                       | 2.3  |
| Valina  | 0.2     | 7.8                                       | 9.5  |
| Aminoácidos totales <sup>e</sup>                        | 6.6     | 133.0                                     | 163.0                                      |
| Lisina disponible                                       | 0.2     | 8.1                                       | 9.6  |

<sup>a</sup> Cansource Biofuels, Mayerthorpe, Alberta, Canada.

<sup>b</sup> Hartland Colony, Bashaw, Alberta, Canada.

<sup>c</sup> suministrado por kilogramo de dieta: 7500 IU de vitamina A, 750 UI de vitamina D, 50 UI de vitamina E, 37.5 mg de niacina, 15 mg de ácido pantoténico, 2.5 mg de folacina, 5

mg de riboflavina, 1.5 mg de piridoxina, 2.5 mg de tiamina, 2000 mg de colina, 4 mg de vitamina K, 0.25 mg de biotina y 0.02 mg de vitamina B<sub>12</sub>.

<sup>d</sup> suministrando por kilogramo de dieta: 125 mg de Zn, 50 mg de Cu, 75 mg de Fe, 25 mg de Mn, 0.5 mg de I y 0.3 mg de Se.

<sup>e</sup> Aminoácidos no esenciales (g por kg) de dieta N-Libre: alanina, 0.3; ácido aspártico, 0.4; cisteína, 0.2; ácido glutámico, 0.5; glicina, 0.5; prolina, 0.9; serina, 0.2; tirosina, 0.3. Aminoácidos dispensables (g por kg) de dieta pasta de canola extraída por presión-frío: alanina, 6.8; ácido aspártico, 10.6; cisteína, 3.2; ácido glutámico, 24.2; glicina, 7.5; prolina, 5.7; serina, 5.4; tirosina, 4.3. Aminoácidos dispensables (g por kg) de dieta pasta de canola extraída por presión-vapor: alanina, 8.2; ácido aspártico, 12.6; cisteína, 4.0; ácido glutámico, 30.3; glicina, 9.2; prolina, 7.7; serina, 6.8; tirosina, 5.0.

#### 1.4.2. *Procedimiento experimental*

El experimento se realizó en el Centro Tecnológico y de Investigación Porcina (Swine Research and Technology Centre) de la Universidad de Alberta (Edmonton, Alberta, Canadá). Seis cerdos castrados Hypor (peso inicial promedio  $65.7 \pm 1.7$  kg) se intervinieron quirúrgicamente con una cánula tipo "T" en el íleon distal, aproximadamente 5 cm antes del ligamento ileocecal (Sauer et al., 1983; de Lange et al., 1989). Para la preparación de la cánula, el cuidado pre y postoperatorios se siguió el protocolo descrito previamente por Li et al. (1993). Después del procedimiento quirúrgico, los cerdos se recuperaron en un periodo de siete días, se observó un incremento gradual en el consumo de alimento y enseguida se les ofrecieron las dietas experimentales. Después de los siete días de recuperación, los cerdos se alojaron en jaulas metabólicas individuales (1.2 m ancho, 1.4 m largo y 0.94 m alto). Las jaulas se equiparon con un comedero de acero inoxidable en la parte delantera de la jaula, una taza con un bebedero tipo chupón al lado del comedero, paredes de plástico y piso de rejilla en una sala con temperatura controlada ( $20.0 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ ). Cada periodo consistió de 9 días, de estos 5 días de adaptación a las dietas experimentales, seguido por 2 días de colección

de heces y 2 días de colección de digesta ileal. Los cerdos fueron alimentados 2.8 veces del requerimiento de energía ( $2.8 \times 110$  kcal ED por kg de peso corporal<sup>0.75</sup>; NRC, 1998), la cual se dividió en 2 comidas de igual proporción a las 0800 y 1500 h con agua a libre acceso durante todo el experimento.

Las heces se colectaron usando bolsas de plástico unidas a la piel alrededor del ano (van Kleef et al., 1994). Las muestras de digesta se colectaron durante dos días de 0800 a 1800 h usando bolsas de plástico conteniendo 15 mL de ácido fórmico unidas al orificio de la cánula sujetadas con una banda elástica. Las bolsas fueron reemplazadas tan pronto se llenaron o después de 20 min (Li et al., 1993). Las heces y digesta se agruparon para cada cerdo dentro del periodo experimental y se congelaron a -20°C. Previo a los análisis, las heces y digesta se descongelaron, homogenizaron, submuestrearon y liofilizaron.

#### 1.4.3. *Análisis químico*

Las dietas, pastas de canola, heces y contenido ileal liofilizadas se molieron a través de una criba de 1 mm en un molino de centrifuga (Retsch GmbH, Haan, Alemania). Se analizó almidón en los ingredientes usando el método de aminoglucosidasa/ $\alpha$ -amilasa con un análisis final de glucosa usando un espectrofotómetro a 510 nm (método 996.11; AOAC, 2006), FDA (método 973.18; AOAC, 2006), FDN (Holst, 1973), Ca y P (método 985.01; AOAC, 2006), fibra cruda (método 978.10; AOAC, 2006). Se analizó en ingredientes y dietas el contenido de extracto etéreo (método 920.39; AOAC, 2006) y cenizas (método 942.05; AOAC, 2006). En ingredientes, dietas y contenido ileal se analizó proteína cruda (método 990.03; AOAC, 2006), AA (método 982.30E; AOAC, 2006) y lisina

disponible (método 975.44; AOAC, 2006). El análisis de humedad se realizó en ingredientes, dietas, contenido ileal y heces (método 930.15; AOAC, 2006) estos análisis se realizaron en la Universidad de Missouri, Columbia. Dietas, digesta y heces se analizaron para MS (método 930.15; AOAC, 2006) y EB usando una bomba calorimétrica adiabática (modelo 5003, Ika-Werke GMBH & Co KG, Staufen, Alemania); se utilizó ácido benzoico como estándar. Se determinó el contenido de óxido de titanio en dietas, contenido ileal y heces por espectrofotometría (modelo 80-2097- 62, KBUltraspec III, Pharmacia, Cambridge, UK) a 450 nm después de incinerar las muestras a 525°C durante toda la noche (Myers et al., 2004) en la Universidad de Alberta, Edmonton Canadá. El contenido de glucosinolatos de pasta de canola extraída por presión en frío y extraída por presión con vapor se determinó por cromatografía de gases, usando el método de Comisión Canadiense de Granos desarrollado por Heaney y Fenwick (1980) y modificado por Daun y McGregor (1981).

#### 1.4.4. *Cálculos*

Los cálculos de digestibilidad se realizaron utilizando los datos de óxido de titanio correspondiente a cada muestra. La digestibilidad aparente en el tracto total (DATT) y digestibilidad ileal aparente (DIA) de energía de las dietas se calcularon con la siguiente ecuación (Stein et al., 2007):  $DATT \text{ o } DIA \text{ dieta, \%} = 1 - \frac{(\text{concentración de óxido de titanio en la dieta} \times \text{concentración de energía en heces o contenido ileal})}{\text{concentración de óxido de titanio en heces o contenido ileal} \times \text{energía bruta en la dieta}} \times 100$ .

El contenido de energía digestible de los ingredientes se calculó multiplicando EB por el valor de su digestibilidad (Adeola, 2001). El contenido de energía neta de ingredientes se determinó por la ecuación de predicción 4 en Noblet et al. (1994) utilizando para su determinación el contenido de ED y el contenido analizado de fibra cruda, almidón, proteína cruda y grasa cruda.

La relación de almidón de maíz y aceite de canola en las dietas experimentales fue idéntico a la dieta libre de nitrógeno permitiendo la medición de la digestibilidad de energía de PCEF y PCEV usando el método de diferencia (Stein et al., 2006). La DIA para AA en dietas se determinó usando el método directo (Ecuación 2; Stein et al., 2007). Cada cerdo alimentado con la dieta libre de N se utilizó para calcular su pérdida endógena basal de AA (Ecuación 3; Stein et al., 2007). La digestibilidad ileal estandarizada (DIE) para AA en las pastas de canola se calculó utilizando DIA y la pérdida de AA endógenos basales (Ecuación 7; Stein et al., 2007). El contenido de AA digestibles estandarizados se determinó de acuerdo a Stein et al. (2007).

#### 1.4.5. *Análisis estadístico*

La dieta libre de nitrógeno se utilizó solamente para cálculos y se excluyó de los análisis estadísticos. Los datos se analizaron por ANOVA usando el procesamiento MIXED (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Cuando el análisis estadístico resultó significativo, las medias de tratamientos (PCEF vs PCEV) se compararon usando el procedimiento prueba t de Student de SAS. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0.05$ .

### **1.5. Resultados**

El contenido de grasa cruda se incrementó 2 veces en pasta de canola prensada en frío comparada con la grasa extraída por presión con vapor. El contenido de proteína cruda y aminoácidos indispensables fue 16% menor en PCEF que en PCEV. En ambas pasta de canola, el 90% del contenido de lisina se consideró químicamente disponible. El contenido de fibra cruda, fibra ácido detergente y fibra detergente neutra fueron menor en PCEF comparada con PCEV. El contenido total de glucosinolatos de pasta de canola prensada en frío fue 50 % menor que en PCEV (Cuadro 1.2).

**Cuadro 1.2.** Análisis del contenido de nutrientes (g por kg) de pasta de canola extraída por presión en frío (PCEF) y pasta de canola extraída por presión con vapor (PCEV) incluidas en las dietas experimentales (Base MS).

| Variable                         | PCPF <sup>a</sup> | PCEV <sup>b</sup> |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| Humedad                          | 126.9             | 96.2              |
| Proteína cruda                   | 295.6             | 347.3             |
| Grasa cruda                      | 231.4             | 116.6             |
| Fibra cruda                      | 66.9              | 92.0              |
| FDA                              | 131.1             | 165.7             |
| FDN                              | 175.5             | 207.9             |
| Almidón                          | 1.5               | 4.3               |
| Cenizas                          | 51.4              | 63.5              |
| Ca                               | 5.5               | 4.8               |
| P                                | 3.8               | 8.0               |
| Energía bruta (MJ/kg)            | 24.64             | 22.00             |
| Aminoácidos esenciales           |                   |                   |
| Arginina                         | 18.2              | 20.9              |
| Histidina                        | 7.7               | 8.9               |
| Isoleucina                       | 12.0              | 14.0              |
| Leucina                          | 20.9              | 24.6              |
| Lisina                           | 17.4              | 19.8              |
| Metionina                        | 5.4               | 6.4               |
| Fenilalanina                     | 11.8              | 14.4              |
| Treonina                         | 12.7              | 14.8              |
| Triptófano                       | 3.9               | 4.3               |
| Valina                           | 15.3              | 18.0              |
| Aminoácidos totales <sup>c</sup> | 262.8             | 310.8             |
| Lisina disponible                | 15.7              | 17.9              |
| Glucosinolatos        totales    |                   |                   |
| μmol/g <sup>d</sup>              | 5.63              | 11.88             |

<sup>a</sup> Fuente: Cansource Biofuels, Mayerthorpe, Alberta, Canada.

<sup>b</sup> Fuente: Hartland Colony, Bashaw, Alberta, Canada.

<sup>c</sup> Aminoácidos no esenciales (g por kg) de pasta de canola extraída por presión en frío: alanina, 13.6; aspártico ácido, 20.9; cisteína, 6.4; ácido glutámico, 46.8; glicina, 14.6; prolina, 11.9; serina, 11.3; tirosina, 8.6. Aminoácidos dispensables (g por kg) de pasta de canola extraída por presión con vapor: alanina, 15.3; ácido aspártico, 23.7; cisteína, 7.8; ácido glutámico, 56.2; glicina, 17.0; prolina, 15.1; serina, 13.1; tirosina, 10.3.

<sup>d</sup> Contenido de los siguientes glucosinolatos (μmol/g) de pasta de canola extraída por presión en frío: 3-butenilo, 0.47; 4-pentenilo, 0.08; 2-OH-3-butenilo, 0.95; alilo, 0.07; feniletilo, 0.05; 3-CH3-indolil, 0.27; 4-OH-3-CH3-indolil, 3.74. Contenido de los siguientes glucosinolatos (μmol/g) de pasta de canola extraída por presión con vapor: 3-butenilo, 1.95; 4-feniletilo, 0.30; 2-OH-3-butenilo, 4.71; alilo, 0.09; feniletilo, 0.14; 3-CH3-indolil, 0.28; 4-OH-3-CH3-indolil, 4.40.

La DIA y DATT de energía se incrementaron ( $P<0.01$ ) en la dieta PCEF comparada con la dieta con PCEV (Cuadro 1.3); la misma respuesta se observó cuando se utilizaron los ingredientes de prueba (Cuadro 1.4). El contenido de energía digestible y energía neta se incrementó 2.35 y 1.77 MJ por kg ( $P<0.001$ ) en PCEF que para PCEV (Cuadro 1.5). La DIA de cisteína y lisina se incrementaron ( $P<0.01$ ) en la dieta con PCEF comparada con la dieta de PCEV (Cuadro 1.3). La DIE de cisteína, isoleucina, lisina y valina se incrementó en PCEF ( $P<0.05$ ) que en PCEV (Cuadro 1.4). El contenido de AA digestibles estandarizados de todos los aminoácidos fue mayor ( $P<0.01$ ) en PCEV comparada con PCEF (Cuadro 1.5).

**Cuadro 1.3.** Digestibilidad ileal aparente (DIA) y digestibilidad aparente en el tracto total (DATT) de energía y DIA de aminoácidos de dietas<sup>a</sup>

| Variable, %     | PCEF  | PCEV  | EEM  | valor P |
|-----------------|-------|-------|------|---------|
| DIA de energía  | 74.09 | 67.11 | 0.88 | 0.004   |
| DATT de energía | 82.16 | 80.92 | 0.29 | 0.009   |
| DIA de AA       |       |       |      |         |
| Alanina         | 72.61 | 71.23 | 0.72 | 0.140   |
| Arginina        | 82.05 | 80.96 | 0.94 | 0.317   |
| Aspartato       | 69.31 | 67.95 | 1.04 | 0.272   |
| Cisteína        | 72.24 | 68.63 | 0.37 | 0.002   |
| Glutamato       | 82.65 | 81.44 | 0.76 | 0.191   |
| Glicina         | 66.66 | 62.78 | 1.93 | 0.174   |
| Histidina       | 79.43 | 77.93 | 0.66 | 0.099   |
| Isoleucina      | 71.29 | 69.34 | 0.85 | 0.094   |
| Leucina         | 74.08 | 73.29 | 0.98 | 0.470   |
| Lisina          | 74.38 | 69.71 | 0.19 | <0.001  |
| Metionina       | 80.24 | 80.66 | 0.85 | 0.651   |
| Fenilalanina    | 73.55 | 72.15 | 1.02 | 0.251   |
| Serina          | 65.05 | 65.64 | 1.39 | 0.697   |
| Treonina        | 64.98 | 63.22 | 1.16 | 0.222   |
| Triptófano      | 80.11 | 79.17 | 1.84 | 0.640   |
| Tirosina        | 71.47 | 69.95 | 0.97 | 0.209   |
| Valina          | 67.70 | 66.37 | 0.78 | 0.176   |

<sup>a</sup> PCEF = pasta de canola extraída por presión en frío; PCEV = pasta de canola extraída por presión con vapor.

**Cuadro 1.4.** Digestibilidad ileal aparente (DIA) y digestibilidad aparente en el total tracto (DATT) de energía y digestibilidad ileal estandarizada (DIE) de AA de los ingredientes de prueba<sup>a</sup>

| Variable, %     | PCEF <sup>a</sup> | PCEV <sup>b</sup> | EEM  | valor P |
|-----------------|-------------------|-------------------|------|---------|
| DIA de energía  | 56.97             | 43.02             | 1.76 | 0.004   |
| DATT de energía | 68.60             | 66.12             | 0.59 | 0.009   |
| DIE de AA       |                   |                   |      |         |
| Alanina         | 78.70             | 77.10             | 0.67 | 0.086   |
| Arginina        | 85.98             | 85.36             | 0.63 | 0.397   |
| Aspartato       | 74.95             | 73.17             | 0.89 | 0.128   |
| Cisteina        | 77.01             | 72.85             | 0.36 | 0.002   |
| Glutamato       | 85.65             | 84.06             | 0.68 | 0.088   |
| Glicina         | 77.51             | 76.99             | 1.33 | 0.723   |
| Histidina       | 83.32             | 82.05             | 0.53 | 0.088   |
| Isoleucina      | 75.33             | 72.77             | 0.74 | 0.035   |
| Leucina         | 78.02             | 77.12             | 0.85 | 0.361   |
| Lisina          | 78.98             | 74.02             | 0.46 | 0.001   |
| Metionina       | 82.73             | 82.71             | 0.81 | 0.979   |
| Fenilalanina    | 77.48             | 76.10             | 0.87 | 0.198   |
| Serina          | 72.31             | 72.02             | 1.45 | 0.844   |
| Treonina        | 72.03             | 69.48             | 1.30 | 0.136   |
| Triptófano      | 84.19             | 84.90             | 1.62 | 0.686   |
| Tirosina        | 76.06             | 74.09             | 0.95 | 0.121   |
| Valina          | 73.22             | 71.19             | 0.60 | 0.040   |

<sup>a</sup> PCEF = pasta de canola extraída por presión en frío; PCEV = pasta de canola extraída por presión con vapor.

**Cuadro 1.5.** Energía Digestible (ED), energía neta (EN) y contenido de aminoácidos ileal digestibles estandarizados (CADE) de los ingredientes de prueba (base MS).

| Variable     | PCEF <sup>a</sup> | PCEV <sup>a</sup> | EEM   | valor P |
|--------------|-------------------|-------------------|-------|---------|
| ED (MJ/Kg)   | 16.90             | 14.55             | 0.141 | <0.001  |
| EN (MJ/Kg)   | 11.89             | 10.12             | 0.099 | <0.001  |
| CADE (g/kg)  |                   |                   |       |         |
| Alanina      | 10.71             | 11.83             | 0.098 | <0.001  |
| Arginina     | 15.68             | 17.86             | 0.117 | <0.001  |
| Aspartato    | 15.69             | 17.35             | 0.186 | 0.002   |
| Cisteína     | 4.93              | 5.68              | 0.016 | <0.001  |
| Glutamato    | 40.06             | 47.23             | 0.342 | <0.001  |
| Glicina      | 11.29             | 13.11             | 0.208 | 0.003   |
| Histidina    | 6.39              | 7.30              | 0.041 | <0.001  |
| Isoleucina   | 9.05              | 10.17             | 0.093 | <0.001  |
| Leucina      | 16.31             | 18.99             | 0.185 | <0.001  |
| Lisina       | 13.71             | 14.63             | 0.095 | 0.002   |
| Metionina    | 4.47              | 5.29              | 0.046 | <0.001  |
| Fenilalanina | 9.11              | 10.95             | 0.105 | <0.001  |
| Serina       | 8.20              | 9.44              | 0.173 | <0.001  |
| Treonina     | 9.16              | 10.26             | 0.168 | 0.006   |
| Triptófano   | 3.28              | 3.65              | 0.063 | 0.006   |
| Tirosina     | 6.54              | 7.65              | 0.080 | <0.001  |
| Valina       | 11.17             | 12.81             | 0.089 | <0.001  |

<sup>a</sup> PCEF = pasta de canola prensado en frío; PCEV = pasta de canola extraída por presión.

## **1.6. Discusión**

Canola, también conocida como canola baja en glucosinolatos, semilla de colza baja en contenido de ácido erúxico, se posiciona como la segunda mayor cosecha de semillas oleaginosas en el mundo (FAO, 2012; Canola Council Canadá, 2009). En Canadá se cosechó un área record de semilla de canola, con una producción de 13.3 mil toneladas y 7.1 mil toneladas se procesaron para la extracción de aceite en el 2012 (Statistics Canada, 2012). No obstante, la mayoría de semilla de canola procesada en Canadá para la extracción de aceite se realiza utilizando el método de extracción con solventes. Actualmente, 0.35 mil toneladas de semilla de canola son procesadas por el método de extracción por presión con vapor. Además, con el incremento en la producción de biodiesel a partir de semilla de canola y por tanto, de pequeñas biorefinerías locales (Seneviratne, 2009), la disponibilidad de PCEF puede seguir incrementando.

Varios estudios han evaluado la composición de nutrientes y digestibilidad de PCEF (Leming y Lember, 2005; Seneviratne et al., 2011; Geier, 2004) y PCEV (Seneviratne et al., 2010; Woyengo et al., 2010a; Landero et al., 2011) reportando amplia variación, principalmente en el contenido de grasa cruda y por tanto, el contenido de energía. Por ello, es necesaria la caracterización nutricional de estos subproductos de canola para su utilización en la alimentación de cerdos en finalización.

Resultados en el presente estudio, muestran que ambos subproductos de canola son buena fuente de aminoácidos y energía para cerdos. El contenido de energía y DIE de AA se incrementaron en PCEF en comparación con PCEV.

Diferencias en el contenido de grasa cruda debido al método de procesamiento de la semilla de canola pueden afectar la digestibilidad de la energía, modificando el nivel de glucosinolatos y contenido de las fracciones de fibra, probablemente por alteración de las densidades de macronutrientes (Noblet y van Milgen, 2004; Tan et al., 2011; Spragg y Mailer, 2007; Widyaratne y Zijlstra, 2007).

Las principales diferencias en la composición química de pasta de canola sugieren estar relacionadas con la eficiencia en la extracción de aceite entre PCEF y PCEV. El método de extracción por solventes es uno de los más usados por fabricas extractoras, con eficiencia del 95 %, comparado con el método de extracción por presión con vapor, con eficiencia del 75 % y del prensado en frio con tan solo, 50 a 70 % (Seneviratne, 2009; Spragg y Mailer, 2007).

El contenido de grasa cruda fue 2 veces mayor en PCEF comparada con PCEV, resultando un alto contenido de EN calculada para PCEF. Una amplia variación en el contenido residual de aceite y por ello, el resto de macronutrientes para PCEF (12.7 a 25.5 %; Spragg y Mailer, 2007; Geier, 2004; Seneviratne et al., 2011) y para PCEV (9.6 a 13.6 %; Mullan et al., 2000; Glencross et al., 2004; Seneviratne et al., 2010), causado por el variable equipamiento y condiciones de procesamiento utilizado entre los estudios.

Existe poca información acerca del contenido de EN en PCEF. Seneviratne et al. (2011) observaron en muestras de PCEF producidas con diferentes procesamientos, valores de EN con variación de 8.40 a 10.71 MJ por kg. El valor energético de los ingredientes es usualmente evaluado por su contenido de

energía digestible o metabolizable (NRC, 1998). Actualmente, el sistema de EN es preferido ya que proporciona una mejor estimación del requerimiento energético al momento de formular dietas para cerdos (Noblet y van Milgen, 2004). En el presente estudio, el contenido de EN de PCEF fue mayor que en PCEV (11.89 vs 10.12 MJ por kg, respectivamente). Seneviratne et al. (2010), mostraron un contenido similar de EN (10.67 MJ por kg) en PCEV comparado con el valor encontrado de este estudio. Sin embargo, Seneviratne et al. (2011) obtuvieron mayor contenido de EN (11.76 MJ por kg) en PCEV. Montoya y Leterme (2010), demostraron que el contenido de EN de pasta de canola fue más alta en comparación con los datos publicados en la literatura, que se atribuye a un menor contenido de fibra de pasta de canola.

La pasta de canola canadiense contiene 117 g por kg de fibra cruda, 168 g por kg de FDA y 20.7 g por kg de FDN (Seneviratne, 2009), los valores estimados en el presente estudio fueron menores. Montoya y Leterme (2009), reportaron mayor digestibilidad energética en pastas de canola de diferente variedad de semilla, atribuido al menor contenido de FDN en *juncea* amarilla comparada con *napus* negra. En el presente estudio, la dieta con PCEV mostró mayor contenido de FDN que la dieta con PCEF (207.9 vs 175.5 g por kg, respectivamente). El impacto de la fracción de FDN es significativo, considerando que cada g de FDN por kg de materia seca, reduce el contenido de grasa digestible 0.02 g por kg de materia seca (Seneviratne, 2009).

El incremento en el contenido de fibra cruda limita la digestibilidad de energía en subproductos de canola (Bell, 1993). Similarmente, el alto contenido de fibra cruda puede reducir la digestibilidad de AA y proteína cruda (Eggum, 1995; Newkirk, 2002). Bajo condiciones de prensado y cocción, las proteínas pueden interactuar con componentes no proteicos o con las mismas proteínas (Suma y Urooj, 2011). En este sentido, La fibra puede interactuar con la proteína quedando atrapada en la estructura tridimensional de la fibra, lo que la hace inaccesible a la acción de las proteasas, reduciendo la digestibilidad de AA. Seneviratne et al. (2011) observaron un incremento en DIE de AA en PCEF debido a los cambios en fibra cruda comparado con PCEV, debido a diferentes condiciones de procesamiento. En el presente estudio, hubo una reducción de DIE de AA en PCEV, con un contenido de fibra cruda del doble comparado con PCEF.

El contenido de glucosinolatos calculados para la dieta con 500 g por kg de pasta de canola fue de 5.94  $\mu\text{mol}$  por g en PCEV, éste valor fue el doble del nivel de tolerancia aceptado (2.0-2.4  $\mu\text{mol}$  por g) para cerdos en crecimiento. En contraste, en la dieta con PCEF el contenido de glucosinolatos fue 2.80  $\mu\text{mol}$  por g, cercano al nivel máximo tolerable, debido al efecto del método de extracción de aceite (Tripathi y Mishra, 2007).

Landero et al. (2011) observaron resultados similares en PCEV (10.9  $\mu\text{mol}$  por g); sin embargo, en las dietas únicamente se incluyeron 2.2  $\mu\text{mol}$  por g de glucosinolatos para cerdos destetados. Mullan et al. (2000) obtuvieron valores de 10.5  $\mu\text{mol}$  por g de glucosinolatos en PCEV con un nivel máximo de inclusión de

200 g por kg de pasta de canola, correspondiente a la incorporación de 2.1  $\mu\text{mol}$  por g de glucosinolatos en dietas para cerdos en crecimiento. En este sentido, Roth-Maier et al. (2004) sugirieron que cerdos en finalización son los más sensibles a glucosinolatos, mientras que otros autores mencionan que los cerdos en crecimiento se ven más afectados (Corino et al., 1991).

En otro orden, la mayor DIA y DIE de AA en PCEF podría atribuirse a su mayor contenido de aceite. Un incremento en el nivel de aceite de canola en las dietas para cerdos incrementa la digestibilidad de AA (Cervantes-Pham y Stein, 2008; Imbeah y Sauer, 1991; Li y Sauer, 1994; Woyengo et al., 2010b). Cabe mencionar, que los mecanismos por los cuales el aceite de canola podría incrementar la digestibilidad de AA no son claros. Basado en el supuesto de que el tiempo requerido para la digestión de proteínas y absorción de los AA es un factor limitante (Li y Sauer, 1994; Cervantes-Pham y Stein, 2008). Un incremento en el nivel de grasa en la dieta provoca un retraso en el vaciamiento gástrico, lo cual incrementa el tiempo en que las proteínas ingeridas son expuestas a enzimas proteolíticas (Valaja y Silijander-Rasi, 2001). La presencia de grasa en el intestino delgado puede además reducir la velocidad del alimento ingerido, que proporciona mayor tiempo para que AA y péptidos sean absorbidos, resultando en un incremento de digestibilidad de AA (Zhao et al., 2000).

Bajo el método de extracción por presión con vapor, la temperatura en la pasta de canola puede alcanzar los 110 °C (Spragg y Mailer, 2007). Se considera que lisina es susceptible a reacciones con otros componentes cuando en el

proceso se alcanzan temperaturas elevadas (100 °C; Newkirk, 2002); al aplicar calor a una proteína en presencia de azúcares reductores la unión entre el grupo carbonilo de este azúcar reducido y el grupo libre  $\epsilon$ -amino de lisina forma complejos tipo Maillard (Batterham, 1992; van Barneveld, 2008). Así, el calor excesivo en la pasta de canola puede inducir estas reacciones de Maillard y por ello reducir la disponibilidad de aminoácidos, especialmente lisina (Bell, 1993; Mailer, 2004; Seneviratne et al., 2011). Seneviratne et al. (2011) reportaron menor contenido de lisina disponible en PCEF comparada con PCEV (82 vs 92%, respectivamente). Esto puede atribuirse al mayor contenido de proteína cruda en PCEV debido a la mayor eficiencia del método de extracción de aceite. Sin embargo, en el presente experimento, lisina disponible tanto PCEF y PCEV fueron similares (90%). Esto sugiere que las reacciones de Maillard probablemente no afectaron la digestibilidad de PCEV.

### **1.7. Conclusiones**

La calidad nutricional de las pastas de canola extraída por presión en frío y extraída por presión con vapor varía con las condiciones de procesamiento; además el mayor contenido de aceite residual en PCEF incrementó los valores de ED y EN. El contenido de grasa y de fibra cruda fueron factores importantes en el incremento de DIE de AA en PCEF a pesar de su menor contenido de proteína, comparada con PCEV. El alto nivel de glucosinolatos en PCEF puede limitar el nivel de inclusión en dietas para cerdos en finalización. Finalmente, los resultados en el presente estudio de DIE y EN de PCEF y PCEV sugieren ser utilizados al

momento de formular dietas para cerdos en finalización, con el fin de reducir los costos de la alimentación.

### **1.8. Literatura citada**

- Adeola, O., 2001. Digestion and balance techniques in pigs, in: Lewis, A.J., Southern, L.L., (Eds.), Swine Nutrition. CRC Press, New York, pp. 903–916.
- AOAC., 2006. Official Methods of Analysis. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Batterham, E.S., 1992. Availability and utilization of amino acids for growing pigs. Nutrition Research Reviews. 5, 1-18.
- Bell, J.M., 1993. Factors affecting the nutritional value of canola meal: A review. Can. J. Anim. Sci. 73, 679-697.
- Bell, J.M., Rakow, G., Downey, R.K., 2000. Comparisons of amino acid and protein levels in oil-extracted seeds of *Brassica* and *Sinapis* species, with observations on environmental effects. Can. J. Anim. Sci. 80, 169-174.
- Beltranena, E., Zijlstra, R.T., 2011. Feeding value of western Canadian oilseed and biodiesel co-products. In: Proc. 32<sup>nd</sup> Western Nutr. Conf., Edmonton, AB, Canada, 217-238.
- Canola Council of Canada, 2009. Canola Meal Feed Industry Guide 4<sup>th</sup> ed. [http://www.canolacouncil.org/canola\\_meal.aspx](http://www.canolacouncil.org/canola_meal.aspx). Accessed Jan 17, 2013.
- CCAC, 2009. Guidelines on: The Care and Use of Farm Animals in Research Teaching and Testing. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, ON, Canada.
- Cervantes, M., Sauer, W.C., Morales, A., Araiza, B., Espinoza, S., Yañez, J., 2009. Manipulación nutricional del cerdo para disminuir la contaminación ambiental. Revista Computarizada de Producción Porcina. 16, 1.
- Cervantes-Pahm, S.K., Stein, H.H., 2008. Effect of dietary soybean oil and soybean protein concentration of digestible amino acids in soybean products fed to growing pigs. J. Anim. Sci. 86, 1841-1849.
- Corino, C., Baldi, A., Contempo, V., 1991. Influence of low-glucosinolate rapeseed meal on performance and thyroid hormone status of heavy pigs, Anim. Feed Sci. Technol. 35, 321–331.

- Daun, J.K., McGregor, D.I., 1981. Glucosinolate analysis of rapeseed (canola). Pages 111-116 in Method of the Grain Research Laboratory. Can. Grain Comm., Winnipeg, Manitoba, Canada.
- de Lange, C.F.M., Sauer, W.C., Mosenthin, R., Souffrant, W.B., 1989. The effect of feeding different protein-free diets on the recovery and amino acid composition of endogenous protein collected from the distal ileum and feces in pigs. *J. Anim. Sci.* 67, 746–754.
- Eggum, B.O., 1995. The influence of dietary fibre on protein digestion and utilization in monogastrics. *Arch Tierernahr.* 48, 89-95.
- FAO, 2012. Food and Agricultural Organization. Animal Feed Resources Information System. <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/afris/Data/724.HTM>. Accessed Jan. 17, 2013.
- Geier, H., 2004. Canola quality in Alaska (2001 Harvest). Agricultural and Forestry Experiment Station. Research Progress Report 42.
- Glencross, B., Hawkins, W., Curnov, J., 2004. Nutritional assessment of Australian canola meals. II. Evaluation of the influence of the canola oil extraction method on the protein value of canola meals fed to the red seabream (*Pagrus auratus*, Paulin). *Aquaculture Research.* 35, 25-34.
- Guay, F., Trottier, N.L., 2006. Muscle growth and plasma concentrations of amino acids, insulin-like growth factor-I, and insulin growing pigs fed reduced-protein diets. *J. Anim. Sci.* 84, 3010-3019.
- Hansen, J.A., Knabe, D.A., Burgoon, K.G., 1993. Amino acid supplementation of low protein sorghum-soybean meal diets for 20 to 50 kilogram swine. *J. Anim. Sci.* 71, 442-451.
- Heaney, R.K., Fenwick, G.R., 1980. The analysis of glucosinolates in *Brassica* species using gas chromatography. Direct determination of the thiocyanate ion precursors, glucobrassicin and neoglucobrassicin. *J. Sci. Food Agric.* 31, 593–599.

- Imbeah, M., Sauer, W.C., 1991. The effect of dietary level of fat on amino acid digestibilities in soybean meal and canola meal and on rate of passage in growing pigs. *Livest. Prod. Sci.* 29, 227-239.
- Kerr, B.J., McKeith, F.K., Easter, R.A., 1995. Effect on performance and carcass characteristics of nursery to finisher pigs fed reduced crude protein, amino acid supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 73, 433-440.
- Landero, J.L., Beltranena, E., Cervantes M., Araiza A.B., Zijlstra, R.T., 2011. The effect of feeding expeller-pressed canola meal on growth performance and diet nutrient digestibility in weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.11.004.
- Leming, R., Lember, A., 2005. Chemical composition of expeller-extracted and cold-pressed canola meal. *Agraarteadus* 16, 103–109.
- Lewis, A.J., 2001. Amino acid in swine nutrition in: Lewis, A.J., Southern, L.L., (Eds.), *Swine Nutrition*. CRC Press, New York.
- Li, S., Sauer, W.C., 1994. The effect of dietary fat content on amino acid digestibility in young pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 1737-1743.
- Li, S., Sauer, W.C., Fan, M.Z., 1993. The effect of dietary crude protein level on ileal and fecal amino acid digestibility in early weaned pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 70, 117–128.
- López, J., Goodband, R.D., Allee, G.L., Jesse, G.W., Nelssen, J.L., Tokach, M.D., Spiers, D., Becker, B.A., 1994. The effects of diets formulated on an ideal protein basis on growth performance, carcass characteristics, and thermal balance of finishing gilts housed in a hot, diurnal environmental. *J. Anim. Sci.* 72, 367-379.
- Mailer, R., 2004. Canola meal limitations and opportunities. A report for the AOF.
- Montoya, C.A., Leterme, P., 2010. Validation of the net energy content of canola meal and full-fat canola seeds in growing pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 90, 213-219.
- Mullan, B.P., Pluske, J.R., Allen, J., Harris, D.J., 2000. Evaluation of western Australian canola meal for growing pigs. *Aust. J. Agric. Res.* 51, 547–53.

- Myers, W.D., Ludden, P.A., Nayigihugu, V., Hess, B.W., 2004. Technical note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Anim. Sci.* 82, 179-183.
- Newkirk, R.W., 2002. The effects of processing on the nutritional value of canola meal for broiler chickens. PhD thesis. University of Saskatchewan. Saskatoon. Saskatchewan.
- Noblet, J., Fortune, H., Shi, X. S., Dubois S., 1994. Prediction of net energy value of feeds for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 344-354.
- Noblet, J., van Milgen, J., 2004. Energy value of pigs feeds: Effect of pig body weight and energy evaluation system. *J. Anim. Sci.* 82, 229-238.
- NRC, 1998. Nutrient Requirements of Swine, 10th ed. National Academies Press, Washington, DC, USA.
- Roth-Maier, D.A., Bhomer, B.M., Roth F.X., 2004. Effects of feeding canola meal and sweet lupin (*L. luteus*, *L. angustifolius*) in amino acid balanced diets on growth performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs. *Anim. Res.* 53, 21–34.
- Sauer, W.C., Jorgensen, H., Berzins, R., 1983. The modified nylon bag technique for determining apparent digestibilities of protein in feedstuffs for pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 63, 233–237.
- Seneviratne, R.W., 2009. Nutritional characterization of canola coproducts for swine. MSc thesis. Univ. of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- Seneviratne, R.W., Beltranena, E., Newkirk, R.W., Goonewardene, L.A., Zijlstra, R.T., 2011. Processing conditions affect nutrient digestibility of cold-pressed canola cake for grower pigs. *J. Anim. Sci.* 89, 2452-2461.
- Seneviratne, R.W., Young, M.G., Beltranena, E., Goonewardene, L.A., Newkirk, R.W., Zijlstra, R.T., 2010. The nutritional value of expeller-pressed canola meal for grower-finisher pigs. *J. Anim. Sci.* 88, 2073-2083.
- Spragg, J., Mailer, R., 2007. Canola meal value chain quality improvement. A final report prepared for AOF and Pork CRC. JCS Solutions Pty Ltd., Berwick, Victoria, Australia.
- Statistics Canada, 2012. <http://www.statcan.gc.ca> Accessed Jan. 17, 2013.

- Stein, H.H., Gibson, M.L., Pedersen, C., Boersma, M.G., 2006. Amino acid and energy digestibility in ten samples of distillers dried grain with solubles fed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* 84, 853-860.
- Stein, H.H., Seve, B., Fuller, M.F., Moughan, P.J., de Lange, C.F.M., 2007. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *J. Anim. Sci.* 85, 172-180.
- Suma, F.P., Urooj, A., 2011. Influence of processing on dietary fiber, tannin and in vitro protein digestibility of pearl millet. *Food and Nutrition Sciences* 2, 895-900.
- Tan, S.H., Mailer, R.J., Blanchard, C.L., Agboola, S.O., 2011. Canola proteins for human consumption: extraction, profile, and functional properties. *Journal of Food Science.* 76, 16-28.
- Tripathi, M.K., Mishra, A.S., 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 1-27.
- Valaja, J., Silijander-Rasi, H., 2001. Dietary fat supplementation affects apparent ileal digestibility of amino acids and digesta passage rate of rapeseed meal-based diets. In *Digestive Physiology of Pigs*. Linberg, J.E., Ogle, B., ed. CABI, Publishing, New York, NY. 175-177.
- van Barneveld, R.J., 2008. Using Pulses, Canola Meal and Other Strategies to Enhance the Cost-Competitiveness of Swine Diets and Resulting Production Efficiency. *Advances in Pork Production* 19, 247-255.
- van Kleef, D.J., Deuring, K., van Leeuwen, P., 1994. A new method of faeces collection in the pig. *Lab. Anim.* 28, 78-79.
- Widyaratne, G.P., Zijlstra, R.T., 2007. Nutritional value of wheat and corn distiller's dried grain with solubles: Digestibility and digestible contents of energy, amino acids and phosphorus, nutrient excretion and growth performance of grower-finisher pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 87, 103-114.
- Woyengo, T.A., Kiarie, E., Nyachoti, C.M., 2010a. Energy and amino acid utilization in expeller-extracted canola meal feed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* 88, 1433-1441.

- Woyengo, T.A., Kiarie, E., Nyachoti, C.M., 2010b. Metabolizable energy and standardized ileal digestible amino acid contents of expeller-pressed canola meal fed to broiler chicks. *Poultry Science* 89, 1182-1189.
- Zhao, X.T., Wang, L., Lin, H.C., 2000. Slowing of intestinal transit by fat on naloxone-blockable afferent, opioid pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, 866-870.

## **II. Comportamiento productivo y expresión de proteínas transportadoras de aminoácidos catiónicos en cerdos alimentados con dietas altas en proteína o bajas en proteína suplementadas con aminoácidos libres.**

### **2.1. Resumen**

Los efectos de la alimentación con una dieta a base de trigo, baja en proteína suplementada con AA (BP-AA) o una dieta trigo-pasta de soya, alta en proteína conteniendo únicamente AA ligados a proteína intacta (AP), en rendimiento, características de la canal y expresión de transportadores de AA catiónicos; se evaluaron usando (n=12) cerdos (Landrace x Hampshire x Duroc) en diferente proporción, con peso inicial de  $31.7 \pm 2.7$  kg. Los cerdos se alimentaron dos veces al día a las 0700 y 1700 h, consumiendo la misma cantidad de alimento (1.53 kg por día). La dieta BP-AA (11.1% PC) se suplementó con L-Lys, L-Thr y DL-Met, y la dieta AP (19.0% PC) se formuló solo con AA unidos a proteína. Las dietas cubrieron los requerimientos de Lys total (0.95%) para cerdos en crecimiento NRC (1998). La GDP ( $P = 0.052$ ) y eficiencia alimenticia ( $P = 0.053$ ) tendió a ser mayor en cerdos alimentados con la dieta AP. En el caso de Lys la ganancia en peso se incrementó ( $P = 0.025$ ) en cerdos alimentados con la dieta AP. El grosor de la grasa dorsal fue menor ( $P = 0.018$ ) en las canales de cerdos alimentados con la dieta AP. El transportador  $b^{0,+}$  se expresó más en yeyuno pero hubo menor expresión en hígado de cerdos alimentados con la dieta BP-AA ( $P < 0.001$ ). No hubo diferencias en la expresión de  $b^{0,+}$  en íleon, y músculo *longissimus dorsi* (MLD) y *semitendinosus* (MST). La expresión de CAT-1 no obstante, no significativa ( $P = 0.057$ ), tendió a ser mayor en hígado pero menor en MLD ( $P = 0.056$ ) de cerdos alimentados con la dieta BP-AA. La expresión de

transportadores de AA catiónicos  $b^{0,+}$  y CAT-1 en cerdos en crecimiento con alimentación restringida sugiere estar afectada de diferente manera de acuerdo como son suministrados los AA (libres o unidos a proteína) y con el tejido en estudio.

Palabras claves: baja en proteína, alta en proteína, aminoácido, transportador, cerdos

## **2.2. Abstract**

The effects of feeding with a wheat-based, low protein supplemented AA diet (LP-AA) or a wheat-SBM, high protein diet containing only protein-bound AA (HP), on performance, carcass traits and expression of cationic amino acid transporters; were evaluated using (n=12) crossbred (Landrace x Hampshire x Duroc) pigs in different proportion ( $31.7 \pm 2.7$  kg initial body weight - BW). Pigs were fed twice daily at 0700 and 1700 h; pigs were trained to consume the same amount of feed (1.53 kg/d). The LP-AA (11.1%) diet was added with L-Lys, L-Thr, and DL-Met, and HP (19.0%) diet was formulated completely as protein-bound AA. Both diets met the requirement of total Lys (0.95%) for growing pigs (NRC, 1998). The ADG ( $P = 0.052$ ) and gain:feed ( $P = 0.053$ ) tended to be higher, and gain:Lys was higher ( $P = 0.025$ ) in pigs fed the HP diet. Furthermore, in carcass characteristics, back fat depth was smaller ( $P = 0.018$ ) in pigs fed the HP diet. The transporter  $b^{0,+}$  was more expressed in jejunum but less expressed in liver of pigs fed the LP-AA diet ( $P < 0.001$ ). There were no differences in the expression of  $b^{0,+}$  in ileum, LM, and SM. The expression of CAT-1 although non-significant ( $P = 0.057$ ) tended to be higher in liver but lower in LM ( $P = 0.056$ ) of pigs fed the LP-

AA diet. In conclusion, the expression of the cationic AA transporters b<sup>0+</sup> and CAT-1 in feed-restricted growing pigs appear to be differently affected by the form, free or protein-bound, dietary AA are supplied and the studied tissue.

Keywords: low protein, high protein, amino acid, transporter, pigs

### **2.3. Introducción**

La reducción en el contenido de proteína cruda en la dieta (PC), acompañada de suplementación de AA cristalinos es usada para mejorar el perfil de AA y reducir la excreción de nitrógeno en cerdos. Sin embargo, la respuesta en el rendimiento de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína suplementadas con aminoácidos (BP-AA) no es consistente. Algunos reportes muestran que reducciones de 4 o menos unidades porcentuales de PC en dietas maíz-pasta de soya no afectaron el rendimiento ni las características de la canal en cerdos en finalización (Tuitoek et al., 1997; Knowles et al., 1998; Le Bellego et al., 2002). Además, Barrera et al. (2004) mostraron que lisina (Lys) y treonina (Thr) libres podrían reemplazar completamente las pasta de soya en dietas con trigo para cerdos en crecimiento sin afectar su rendimiento. Otros reportes muestran una disminución en el rendimiento y un incremento de la grasa dorsal cuando 4 o más unidades porcentuales se redujeron en dietas maíz o sorgo- pasta de soya (Brudevold y Southern, 1994; Tuitoek et al., 1997; Yue y Qia, 2008). Varios factores se consideran responsables en la disminución del rendimiento de los cerdos, incluyendo diferencias en el sistema de energía (EM vs. EN) en la formulación de las dietas (Noblet et al., 1994), contenido de energía (Kerr et al., 2003), perfil de AA (Brudevold y Southern, 1994), absorción y tasa de acumulación

de proteína (Tuitoek et al., 1997), pero la controversia todavía permanece. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la expresión de transportadores de AA en cerdos alimentados con BP-AA, en comparación con aquellos alimentados únicamente con AA unidos a proteína.

El primer aminoácido limitante en la mayoría de las dietas con base en cereal-pasta de soya para cerdos es lisina (NRC, 1998), no obstante arginina (Arg) y leucina (Leu) son suministrados en exceso. Arg y Lys son absorbidos por el enterocito, con una alta afinidad, por transportadores  $b^{0,+}$  independientes de Na (Majumder et al., 2009) y CAT-1 (Hatzoglou et al., 2004). El sistema  $b^{0,+}$  es el transportador más importante para AA catiónicos expresado en células epiteliales, mientras CAT-1 es expresado en células no epiteliales (Palacin et al., 2001). El sistema  $b^{0,+}$  intercambia Leu por Lys (Torras-Llort et al., 2001), indicando que la absorción intestinal de Lys es acoplada con el flujo de salida de Leu. Un estudio reciente (Morales et al., 2011) muestra que el contenido de Leu:Lys en la dieta afecta la absorción de Lys. Dietas BP-AA no solo contienen bajos niveles de Arg y Leu, además un alto porcentaje de Lys libre, de 44% (Kerr et al., 2003) a 70% (Barrera et al., 2004).

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 AA catiónicos. Asumiendo que la expresión de los transportadores de AA representa plenamente su actividad (Dave et al., 2004; Hatzoglou et al., 2004); esto es asumiendo que la concentración de AA libres en el contenido intestinal y el fluido extracelular de hígado y músculo afecta la absorción y la entrada celular de AA en cerdos, que a su vez puede afectar su disponibilidad y el rendimiento de los cerdos.

Una dieta formulada con trigo como ingrediente principal es deficiente en Lys, Thr y Met para cerdos en crecimiento; no obstante, actualmente estos AA están disponibles en forma libre a un precio competitivo y pueden adicionarse a la dieta sin afectar los niveles de los otros AA. En una dieta BP-AA se eliminan los excesos de otros AA; sin embargo, Ile, Leu y Val pueden llegar a ser marginales; estos AA actualmente no están disponibles en grado alimenticio. Además, una dieta base trigo baja en proteína suplementada con AA contiene alrededor de 66 % de Lys en forma libre y 33 % unida a proteína. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la alimentación de cerdos con una dieta a base de trigo BP-AA que contenía un alto porcentaje de Lys libre y sin exceso de AA o una dieta alta en proteína a base de trigo-pasta de soya, conteniendo únicamente AA de proteína intacta y exceso de algunos de los AA, sobre la expresión de genes que codifican para  $b^{0,+}$  y CAT-1 en yeyuno, íleon, hígado, músculo *longissimus dorsi* (MLD) y *semitendinosus* (MST); y para miosina en MLD y MST, y su relación con el crecimiento productivo y características de la canal.

## **2.4. Materiales y métodos**

### **2.4.1. Animales y alojamiento**

Los cerdos usados en el experimento se cuidaron de acuerdo con las guías establecidas en el Reglamento Oficial Mexicano sobre el Cuidado Animal (NOM-062-Z00-1999, 2001). El experimento se realizó en la Unidad de Metabolismo y Fisiología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. Doce cerdos castrados (Landrace x Hampshire x Duroc) en diferente proporción, con un peso inicial de  $31.7 \pm 2.7$  kg, se distribuyeron en dos grupos con base en el peso inicial, sexo y camada; se asignaron 6 repeticiones (3 machos castrados y 3 hembras) por tratamiento. Los cerdos se alojaron individualmente en jaulas metabólicas con piso elevado (1.2 m ancho, 1.2 m largo y 1.0 m alto) equipado con un comedero de acero inoxidable, un bebedero de tipo chupón y suelo de malla de hierro en una habitación con temperatura controlada (22 – 24 °C). Los cerdos se alimentaron dos veces al día, a las 0700 y a las 1700 horas. Todos los cerdos se entrenaron para consumir la misma cantidad de alimento (1.53 kg por día) durante 30 minutos o menos, y tuvieron agua a libre acceso. Los cerdos se pesaron al inicio y al final de los 23 días de estudio; el peso vivo promedio de los cerdos al final fue  $47.2 \pm 0.88$  kg.

### **2.4.2. Dietas**

Los cerdos se alimentaron con una dieta baja en proteína suplementada con AA (BP-AA) o una dieta alta en proteína (AP; Cuadro 2.1). La dieta BP-AA (11.1% PC) se formuló con trigo como ingrediente principal, el cereal más común utilizado bajo condiciones prácticas en el norte de México y adherida con 0.59% L-

Lys, 0.33% L-Thr, y 0.10% DL-Met; cubriendo el requerimiento de Lys total (0.95%) para cerdos en crecimiento (NRC, 1998). La dieta AP (19.0% PC) se formuló con trigo y pasta de soya para contener 0.95% de Lys total. La dieta BP-AA contenía 62% del total de Lys en forma libre y 38% como proteína intacta. En contraste, el total de lisina de la dieta AP estuvo contenida en la proteína de los ingredientes. Ambas dietas cumplieron o excedieron los requerimientos de la NRC (1998) de vitaminas y minerales, con un contenido 13.8 MJ EM por kg de alimento. Las relaciones de Ile, Leu y Val para Lys fueron 46, 89 y 56 para la dieta BP-AA, y 86, 154 y 101 para la dieta AP, respectivamente.

**Cuadro 2.1.** Formulación de las dietas experimentales baja en proteína suplementada con AA y alta en proteína.

| Ingredientes, %                                 | Dietas             |               |
|---|--------------------|---------------|
|   | Baja proteína + AA | Alta proteína |
| Trigo   | 96.52              | 75.20         |
| Pasta de soya, 48% PC                           |                    | 21.30         |
| L-Lisina • HCl, 78.5%                           | 0.75               |               |
| L-Treonina                                      | 0.33               |               |
| DL-Metionina                                    | 0.10               |               |
| Aceite de soya                                  |                    | 0.50          |
| Carbonato de calcio                             | 1.35               | 1.35          |
| Ortofosfato                                     | 0.40               | 0.40          |
| Sal yodada                                      | 0.35               | 0.35          |
| Premezcla de vitaminas y minerales <sup>a</sup> | 0.20               | 0.20          |
| <i>Contenido de nutrientes y EM calculada</i>   |                    |               |
| EM (MJ/kg)                                      | 13.79              | 13.76         |
| PC, %   | 11.00              | 19.90         |
| <i>Total Lys, %</i>                             | 0.95               | 0.95          |
| DIE Arg, %                                      | 0.52               | 1.13          |
| DIE His, %                                      | 0.26               | 0.37          |
| DIE Ile, %                                      | 0.41               | 0.71          |
| DIE Leu, %                                      | 0.80               | 1.28          |
| DIE Lys, %                                      | 0.90               | 0.83          |
| DIE Met, %                                      | 0.27               | 0.42          |
| DIE Phe, %                                      | 0.55               | 1.20          |
| DIE Thr, %                                      | 0.58               | 0.62          |
| DIE Trp, %                                      | 0.14               | 0.30          |
| DIE Val, %                                      | 0.50               | 0.84          |

<sup>a</sup> suministrado por kilogramo de dieta: vitamina A, 4800 UI; vitamina D3, 800 UI; vitamina E, 4.8 UI; vitamina K3, 1.6 mg; riboflavina, 4 mg; D-ácido pantoténico, 7.2 mg; niacina, 16 mg; vitamina B12, 12.8 µg; Zn, 64 mg; Fe, 64 mg; Cu, 4 mg; Mn, 4 mg; I, 0.36 mg y Se, 0.13 mg.

Las dietas se analizaron (Cuadro 2.2) para proteína cruda (método 984.13; AOAC, 2006) y AA (método 982.30; AOAC, 2006).

**Cuadro 2.2.** Análisis del contenido de proteína cruda y aminoácidos en las dietas experimentales y los requerimientos para cerdos en crecimiento, porcentaje.

| Variable       | Dietas                |               | Requerimientos AA<br>NRC (1998) |
|----------------|-----------------------|---------------|---------------------------------|
|                | Baja proteína +<br>AA | Alta proteína |                                 |
| Proteína cruda | 11.10                 | 20.30         |                                 |
| Arginina       | 0.58                  | 1.27          | 0.37                            |
| Histidina      | 0.30                  | 0.44          | 0.30                            |
| Isoleucina     | 0.45                  | 0.85          | 0.51                            |
| Leucina        | 0.87                  | 1.45          | 0.90                            |
| Lisina         | 0.95                  | 0.96          | 0.95                            |
| Metionina      | 0.31                  | 0.51          | 0.25                            |
| Fenilalanina   | 0.60                  | 1.46          | 0.55                            |
| Treonina       | 0.64                  | 0.75          | 0.61                            |
| Valina         | 0.54                  | 1.02          | 0.64                            |

#### *2.4.3. Colección de tejidos*

Al final del experimento, todos los cerdos se sacrificaron, por aturdimiento eléctrico y desangrado, para la evaluación de las características de la canal y para la colección de tejidos, tres horas después de su última alimentación a las 0700 h. Los cadáveres se evisceraron inmediatamente y se colectaron muestras de tejidos corporales en microtubos Eppendorf de 2 ml (aproximadamente 0.5 g) por medio del raspado de la mucosa de la parte media del yeyuno e íleon terminal; el yeyuno e íleon son los principales sitios de absorción de AA y péptidos (Silk et al., 1985). También se colectaron muestras de hígado, MLD y MST (aproximadamente 0.5 a 1.0 g). Todas las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, y se mantuvieron almacenadas a -82° C hasta su análisis. El proceso total de colección tomó no más de 8 minutos para maximizar la calidad del ARN extraído. Se evaluaron además las características de la canal, el contenido de grasa y proteína (kg) en la canal se estimaron de acuerdo a Kloareg et al. (2006).

#### *2.4.4. Extracción de ARN y transcripción reversa*

##### *2.4.4.1. Extracción total de ARN y purificación*

Las muestras de la mucosa intestinal (yeyuno e íleon), hígado, MST y MLD se trataron para extraer ARN por pulverización en nitrógeno líquido (Méndez et al., 2011) siguiendo las instrucciones del uso del reactivo Trizol (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA, USA). El ARN purificado se diluyó en 30 µl de agua destilada libre de ARNasas siendo almacenado a -82 °C. La concentración total de ARN se determinó por espectrofotometría (Helios β, Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA) a 260 nm, y la pureza del ARN se evaluó mediante el uso de la relación

A260/A280, que varió desde 1.8 a 2.0 (Sambrook y Russell, 2001). La integridad del ARN total se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Todas las muestras de ARN tuvieron buena calidad con una relación de ARNr 28S:18S alrededor de 2.0:1 (Sambrook y Russell, 2001).

#### *2.4.5. Transcripción reversa*

Aproximadamente 2 µg de ARN total se trataron con 1 U de ADNasa I (1 U por µl; Invitrogen) en 6 µl de transcripción reversa buffer 5x y 23 µl de agua tratada con DEPC; la reacción se mantuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos a 70 °C para detener la reacción. La transcripción reversa se inició con las muestras de ARN tratadas con ADNasa, se adicionó 1 µl de oligonucleótidos aleatorios (150 ng por µl, Invitrogen) y 1 µl de solución de dNTPs (cada uno 10 µM), la reacción se incubó a temperatura ambiente y enseguida se enfrió en hielo durante 1 minuto; se agregaron 3 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de inhibidor de ribonucleasa (40U por µl; RNase OUT, Invitrogen), se agregó a la reacción 2 µl de transcripción reversa buffer 5x y se incubó a 42 °C durante dos minutos para estabilizar la reacción antes de la adición de 1 µl de enzima reversa transcriptasa (200 U por µl; RT-Superscript III, Invitrogen). La reacción se incubó a 42 °C durante 50 minutos. La mezcla se incubó a 70 °C durante 15 minutos enfriándose en hielo para detener la reacción. Las muestras de ADNc se cuantificaron espectrofotométricamente y diluyeron a una concentración final de 50 ng por µl.

#### *2.4.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativo*

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para el transportador de AA b<sup>0,+</sup> y miosina (isoformas IIB de cadena pesada) de acuerdo con sus secuencias

publicadas en el Genbank (Cuadro 2.3). El tipo de fibras IIB representan aproximadamente el 80% de la fibras totales en algunos músculos de cerdos (Czerwinski y Martin, 1994) y son extensamente expresadas en MST y MLD de cerdos (Lefaucheur et al., 2002). Además, se utilizó un ARNr 18S (GenBank AY265350) como un control endógeno para normalizar las variaciones en el ARNm. Antes de iniciar, se realizó PCR de punto final para estandarizar las condiciones de amplificación para cada par de oligonucleótidos, con el fin de confirmar la especificidad de los productos de PCR en relación con su ARNm, una muestra de cada producto de PCR se clonó dentro de un vector 4.0 (invitrogen) siendo secuenciado en el Centro de Secuenciación Davis (Davis, CA, USA).

**Cuadro 2.3.** Oligonucleótidos usados para el análisis de PCR cuantitativo de ADNc derivado del ARNm del transportador de aminoácidos catiónicos b<sup>0,+</sup> y miosina, y el ARN ribosomal 18S

| ARNm   | Oligo-nucleótido | Localización (pb) | Secuencia                  | Tamaño (pb) |
|--|------------------|-------------------|----------------------------|-------------|
| Transportador de aminoácidos catiónicos b <sup>0,+</sup> AT (SLC7A9) (GenBank: EF127857) |                  |                   |                            |             |
|  | Sentido          | 1-19              | 5'CGGAGAGAGGATGAGAAGT3'    | 562         |
|  | Antisentido      | 545-562           | 5'GCCCCGCTGATGATGATGATGA3  |             |
| Transportador de aminoácidos catiónicos-1, CAT-1 (GenBank: AY371320)                     |                  |                   |                            |             |
|  | Sentido          | 4239-4258         | 5'-GTCGGTTGCAAAGACCATTT-3' | 329         |
|  | Antisentido      | 4548-4567         | 5'-GAGCGGTGCTGACAACAGTA-3' |             |
| Miosina, cadena pesada 4 (GenBank: NM_001123141)   |                  |                   |                            |             |
|  | Sentido          | 4582-4599         | 5'AGATTTCTGACCTGACTG3'     | 340         |
|  | Antisentido      | 4904-4921         | 5'TCTCCCTCCATCTTCTTC3'     |             |
| ARNr 18S (GenBank: AY265350)   |                  |                   |                            |             |
|  | Sentido          | 236-255           | 5'GGCCTCACTAAACCATCCAA3'   | 295         |
|  | Antisentido      | 511-530           | 5'TAGAGGGACAAGTGGCGTTC3'   |             |

Las expresiones de  $b^{0,+}$ , CAT-1, y miosina se estimaron por PCR cuantitativo (PCRc) usando SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Corp., Glen Burnie, MD, USA) en un Cromo 4-ADN (Bio-Rad, Herefordshire, England) con el software MJ Opticon Monitor 3.1. El equipo se calibró con una curva estándar usando el ARNr 18S clonado en el vector TOPO 4.0. La curva estándar se obtuvo usando una concentración conocida de ADNc y diluciones seriadas del mismo producto. Las reacciones para PCR cuantitativo contenían 50 ng de ADNc, 0.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido específico, 12.5  $\mu$ l de 2x SYBR green/ROX qPCR Master Mix, y agua libre de ADNasa/ARNasa para completar el volumen final de 25  $\mu$ l. Las condiciones de la PCR utilizadas en la amplificación y la cuantificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización (95  $^{\circ}$ C por 1 min), seguido por 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95  $^{\circ}$ C durante 30 segundos, alineamiento 56  $^{\circ}$ C 15 segundos y extensión a 72  $^{\circ}$ C durante 30 segundos) y un programa de curva de desnaturalización (60 $^{\circ}$ C a 90 $^{\circ}$ C). La fluorescencia se midió al final de cada ciclo y cada 0.2  $^{\circ}$ C durante el programa de desnaturalización.

#### *2.4.7. Análisis estadístico*

Se realizaron análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del SAS (Statistical Analysis System 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). Se realizaron comparaciones de medias usando una prueba de  $t$  de Student. Los niveles de probabilidad de  $P \leq 0.05$ , y  $0.05 < P \leq 0.10$  se definieron como diferencias significativas y tendencias respectivamente.

## **2.5. Resultados**

La técnica de PCR cuantitativo realizada en este estudio se validó por secuenciación de sus productos finales en el Centro de Secuenciación Davis (Davis, CA). Los resultados de secuenciación revelaron que los productos para  $b^{0,+}$ , CAT-1, miosina y ARNr 18S son 100% homólogos con sus correspondientes secuencias esperadas adquiridas de las secuencias de plantilla virtual reportadas en el Genbank. Estudios previos revelan que la expresión de ARNr 18S es muy estable y su contenido puede ser usado como control endógeno para normalizar la expresión de otros genes en respuesta a varios estímulos (Liao et al., 2009). En este estudio, se normalizó la expresión relativa de  $b^{0,+}$ , CAT-1, miosina, ARNm con la expresión de ARNr 18S. Por consiguiente, los niveles de expresión ARNr 18S se utilizaron para normalizar la cuantificación relativa de cada expresión de ARNm asociado a transportadores de AA por el epitelio del intestino delgado y músculos. Todos los cerdos permanecieron saludables durante el experimento. El análisis de composición de AA de las dietas mostró que la dieta BP-AA fue marginal en Ile, Leu y Val (Cuadro 2.2).

Los resultados de rendimiento son presentados en el Cuadro 2.4. La ingesta de alimento se restringió a 1.53 kg por día para todos los cerdos. La ganancia diaria de peso (GDP;  $P = 0.052$ ) y eficiencia alimenticia ( $P = 0.053$ ) tendieron a ser mayores, y la relación Lys:ganancia se incrementó ( $P = 0.025$ ) en cerdos alimentados con la dieta AP.

**Cuadro 2.4.** Rendimiento de cerdos alimentados con dietas a base de trigo, baja en proteína suplementada con aminoácidos (BP-AA) o alta en proteína (AP).

| Variable                                 | Tratamientos |       | EE <sup>a</sup> | valor P |
|--|--------------|-------|-----------------|---------|
|  | BP-AA        | AP    |                 |         |
| Ganancia peso corporal, g/d              | 642          | 709   | 0.022           | 0.052   |
| Ingesta de alimento, kg/d                | 1.53         | 1.53  | -               | -       |
| Lys ingerida, g/d                        | 14.6         | 14.6  | -               | -       |
| Ganancia peso corporal: ingesta alimento | 0.420        | 0.460 | 0.014           | 0.053   |
| Ganancia peso corporal: ingesta Lys      | 44.1         | 48.7  | 1.48            | 0.025   |

<sup>a</sup> EE= error estándar

Los resultados sobre las características de la canal se muestran en el Cuadro 2.5. Puede observarse que el espesor de la grasa dorsal fue menor ( $P = 0.018$ ) en cerdos alimentados con la dieta AP; sin embargo, no se detectó ningún efecto en el área del ojo del lomo ( $P = 0.722$ ), peso canal caliente ( $P = 0.814$ ) y canal libre de grasa ( $P = 0.521$ ), contenido (kg) de proteína ( $P = 0.365$ ) y grasa ( $P = 1.000$ ) en la canal, ni en el peso de la canal libre de grasa como porcentaje del peso de la canal caliente ( $P = 0.391$ ).

**Cuadro 2.5.** Características de la canal de cerdos alimentados con dietas a base de trigo, baja en proteína suplementada con aminoácidos (BP-AA) o alta en proteína (AP)

| Variable                            | Tratamientos |      | EE <sup>b</sup> | valor P |
|-------------------------------------|--------------|------|-----------------|---------|
|                                     | BP-AA        | AP   |                 |         |
| Peso canal caliente, kg             | 25.8         | 26.1 | 0.782           | 0.814   |
| area ojo lomo, cm <sup>2</sup>      | 25.0         | 24.5 | 0.966           | 0.722   |
| Grasa dorsal, cm                    | 1.08         | 0.85 | 0.058           | 0.018   |
| Contenido proteína, kg <sup>a</sup> | 7.38         | 7.57 | 0.137           | 0.365   |
| Peso grasa, kg <sup>a</sup>         | 2.41         | 2.39 | 0.073           | 1.000   |
| Peso libre de grasa, kg             | 23.0         | 23.7 | 0.753           | 0.521   |
| Peso libre de grasa, %              | 89.0         | 91.0 | 1.539           | 0.391   |

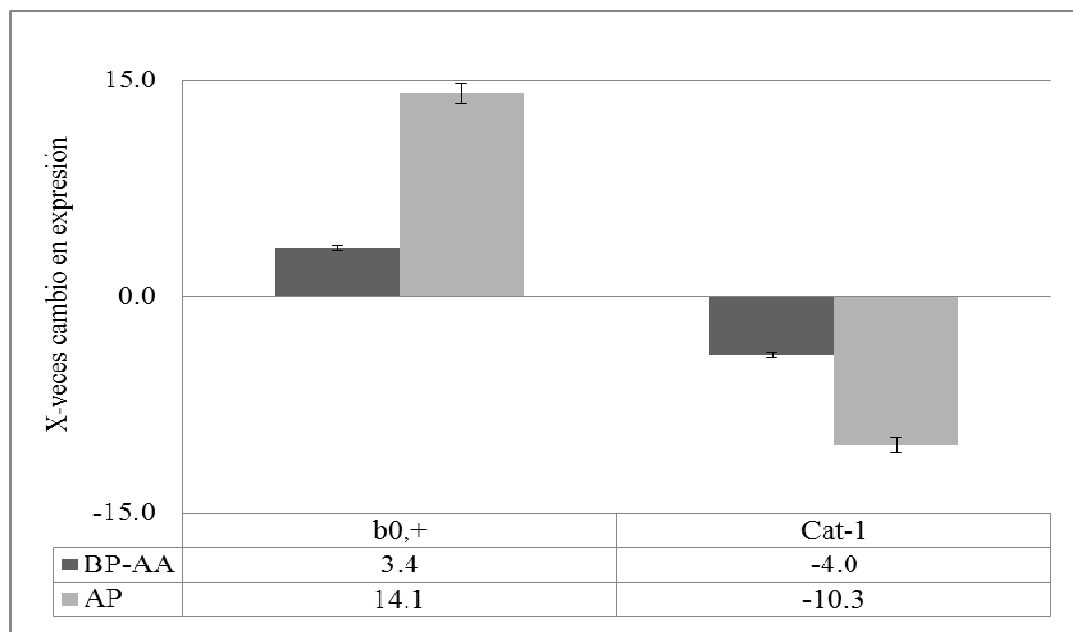
<sup>a</sup> Calculado con la ecuación de Kloareg et al. (2006).

<sup>b</sup> EE= error estándar

Los resultados de expresión de proteínas se muestran en el Cuadro 2.6. El transportador  $b^{0,+}$  se expresó más en yeyuno con menor expresión en hígado de cerdos alimentados con la dieta BP-AA ( $P < 0.001$ ); se estimó una correlación de Pearson negativa en la expresión de  $b^{0,+}$  entre yeyuno e hígado ( $r = -0.83$ ;  $P < 0.001$ ). No hubo diferencias en la expresión de  $b^{0,+}$  en íleon ( $P = 0.473$ ), MLD ( $P = 0.393$ ), y MST ( $P = 0.613$ ). Aunque no se analizaron estadísticamente, la expresión en íleon sugiere ser mayor que en yeyuno. La expresión de CAT-1 tendió a ser mayor en hígado ( $P = 0.057$ ) pero menor en MLD ( $P = 0.056$ ) de cerdos alimentados con la dieta AP; no se observaron diferencias en yeyuno, íleon o MST. No se encontró efecto de tratamientos en la expresión de miosina en MLD ( $P = 0.433$ ) y MST ( $P = 0.999$ ), respectivamente.

**Cuadro 2.6.** Expresión de  $b^{0,+}$  en dos segmentos del intestino delgado (yeyuno e íleon), hígado, músculo *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus*, y miosina en músculos de cerdos alimentados con una dieta baja en proteína suplementada con Lys, Thr y Met libres (BP-AA) o alta en proteína (AP) (unidades arbitrarias: relación de ARNm: ARNr 18S).

| Transportador | Tejido                | Tratamientos |        | EE     | valor P |
|---------------|-----------------------|--------------|--------|--------|---------|
|               |                       | BP-AA        | AP     |        |         |
| $b^{0,+}$     | Yeyuno                | 0.1037       | 0.0405 | 0.0069 | <0.001  |
|               | Íleon                 | 0.348        | 0.571  | 0.211  | 0.473   |
|               | Hígado                | 0.0029       | 0.0134 | 0.0013 | <0.001  |
|               | <i>Longissimus</i>    | 0.0059       | 0.0049 | 0.0008 | 0.393   |
|               | <i>Semitendinosus</i> | 0.0018       | 0.0011 | 0.0089 | 0.613   |
| CAT-1         | Yeyuno                | 0.0093       | 0.0247 | 0.007  | 0.170   |
|               | Íleon                 | 0.0023       | 0.0024 | 0.0006 | 0.976   |
|               | Hígado                | 0.0052       | 0.0008 | 0.0015 | 0.057   |
|               | <i>Longissimus</i>    | 0.0033       | 0.0087 | 0.0018 | 0.056   |
|               | <i>Semitendinosus</i> | 0.0033       | 0.0217 | 0.0106 | 0.246   |
| Miosina       | <i>Longissimus</i>    | 0.0047       | 0.0060 | 0.0011 | 0.433   |
|               | <i>Semitendinosus</i> | 0.0045       | 0.0045 | 0.0009 | 0.999   |



**Figura 1.** Cambios en la expresión de  $b^{0,+}$  y CAT-1 en íleon comparado con yeyuno de cerdos alimentados con dietas baja en proteína suplementada con aminoácidos (BP-AA) o alta en proteína (AP).

## 2.6. Discusión

Los cerdos utilizados en el presente estudio se alimentaron en pareja para eliminar algún efecto potencial de diferencias en consumo diario de alimento (CDA) y que a su vez pudiera afectar las variables evaluadas. El CDA de los cerdos fue menor que los valores estimados por NRC (1998; 12%), o el valor observado por Tuitoek et al. (1997; alrededor de 26%) y por Kerr et al. (2003; alrededor de 16%) en cerdos en crecimiento. La GDP de cerdos en este estudio fue aproximadamente 18% menor al valor reportado por Tuitoek et al. (1997), y similar a lo publicado por Kerr et al. (2003).

Estos resultados sugieren un rendimiento satisfactorio; sin embargo, el CDA se restringió e Ile, Leu y Val fueron marginales en la dieta BP-AA. Como se muestra en el Cuadro 2, la dieta BP-AA fue ligeramente deficiente en Ile, Leu y Val

pero tuvo un perfil de AA más cercano a la proteína ideal en comparación con la dieta AP.

En el presente estudio, la GDP tendió a ser mayor en los cerdos alimentados con la dieta AP. Sin embargo, cuando se compararon las características de la canal de los cerdos alimentados con la dieta BP-AA o la dieta AP, no se detectaron diferencias en el contenido de proteína y grasa en la canal, peso de la canal libre de grasa, y área del ojo del lomo. Nieto et al. (2003), encontraron un incremento de 7.7% en el peso del tracto gastrointestinal en cerdos variando en peso de 15 a 50 kg, al aumentar el contenido de PC en la dieta de 10.1 a 22.3%; el rango de peso de los cerdos del actual estudio (32 a 47 kg) y el contenido de PC (11.0 y 20.3%) fueron similares a lo reportado por estos autores. Estos resultados sugieren que la tendencia para un incremento en la ganancia de peso vivo observado en los cerdos alimentados con la dieta AP podrían atribuirse a un incremento en el peso del tracto gastrointestinal y su contenido; cabe mencionar, que este estudio duró solo 21 días y la dieta BP-AA fue marginal en Ile, Leu y Val, pudieran explicar parcialmente la diferencia inexistente en el contenido de proteína y grasa de la canal.

La reducción en la tasa de acumulación de proteína sugiere una posible causa de la reducción del rendimiento y de la obtención de canales de cerdos en finalización con mayor contenido de grasa cuando fueron alimentados con dietas BP-AA base maíz o sorgo (Hansen et al., 1993; Tuitoek et al., 1997; Brudevold y Southern, 1994). De acuerdo a Czerwinski y Martin (1994), miosina es la proteína más abundante en células musculares, la isoforma IIB conforma alrededor del

80% del total de fibras en algunos músculos de cerdos; esta isoforma es expresada de manera abundante en MLD y MST (Lefaucheur et al., (2002). Brodsky et al. (2004) encontraron que la baja ingesta de PC reduce la síntesis de miosina en humanos, sugiriendo que miosina es un buen indicador de la síntesis y acumulación de proteína en cerdos.

En el estudio actual, la expresión de la isoforma IIB de miosina en MLD y MST no fue diferente ( $P>0.05$ ) entre cerdos alimentados con las dietas BP-AA o AP siendo consistente con inexistentes diferencias en el área del ojo del lomo y la proteína de canal. Debido a que el proceso de síntesis de proteína es regulado por la presencia intracelular de AA disponibles (Miyazaki y Esser, 2009), estos resultados podrían sugerir que la disponibilidad de AA para la síntesis y acumulación de proteína muscular no se afectaron por la forma (parcialmente libre o totalmente ligada a proteína) en la cual Lys, Thr y Met se suministraron a estos cerdos. Sin embargo, no está clara la razón por la cual el grosor de la grasa dorsal fue mayor en los cerdos alimentados con la dieta BP-AA.

Se sugiere que los cerdos alimentados con dietas bajas en proteína suplementadas con AA cristalinos tienen un menor rendimiento debido a que los AA dentro de la proteína de ingredientes alimenticios son digeridos y absorbidos más lentamente comparados con los AA libres (Hansen et al., 1993). De acuerdo a Rerat et al. (1992), los AA libres aparecen más rápidamente en la sangre portal en comparación con los que están unidos a proteína, y pudiendo oxidarse antes de su utilización en la síntesis de proteína; este proceso requiere que todos los AA estén

disponibles dentro de la célula en la cantidad precisa y al mismo tiempo (Kobayashi et al., 2003).

Suponiendo que la expresión de los transportadores de AA catiónicos representan su actividad funcional, los resultados del presente estudio son similares con los publicados por Rerat et al. (1992) en cuanto a su velocidad de absorción. En relación a la tasa de oxidación, Nolles et al. (2009) encontraron que, en un tiempo corto de 5 días, los AA libres son oxidados más rápidamente que aquellos unidos a proteína aunque estas diferencias desaparezcan después de 20 días de adaptación. En el estudio actual, las muestras de tejido se colectaron a los 23 días de adaptación a las dietas. Con base en esos resultados, la poca o nula variación en la tasa de oxidación de aminoácidos libres y unidos a proteína podría ser esperada al final del presente experimento.

La absorción intestinal y la captación de AA por células de hígado y músculo se relaciona con la abundancia, especificidad y actividad de los transportadores de AA (Broer, 2008) en tejidos particulares (Palacin et al., 2001; Torrast-Llort et al., 2001) que, a su vez, puede ser afectada por la concentración en la dieta de cada AA y de las posibles interacciones entre ellos (Kilberg et al., 2005).

La comprensión del mecanismo por el cual los AA son liberados desde el enterocito hacia las células musculares puede ayudar a explicar mejor las variaciones en el rendimiento de los cerdos alimentados con la dieta BP-AA en comparación con aquellos alimentados con la dieta AP. Lys y Arg son transportados por el sistema  $b^{0,+}$  independiente de Na y CAT-1 (Majumder et al.,

2009); estos son los principales transportadores de AA catiónicos en mamíferos (Palacin et al., 2001; Broer, 2008). El transportador  $b^{0,+}$  es expresado principalmente en células epiteliales y funciona como un sistema antiporte de intercambio de Leu por Lys; la absorción de Lys está acoplada con la salida de Leu. Por ello, la abundancia de  $b^{0,+}$  es crítica cuando los cerdos son alimentados con dietas BP-AA debido a que Lys en su mayoría es suministrada en forma libre (62%) y sin exceso de Leu, comparado con la dieta AP. CAT-1 es principalmente expresado en células no epiteliales (Hatzoglou et al., 2004).

En este estudio la expresión de  $b^{0,+}$  en yeyuno se incrementó 2.6 veces en cerdos alimentados con la dieta BP-AA, lo cual se esperaba ya que la mayoría de Lys se encontraba fácilmente disponible para la absorción justo después de alcanzar el intestino delgado. Morales et al. (2011) encontraron resultados similares con cerdos en crecimiento alimentados con dietas base trigo bajas en PC (11.0 vs. 19.0%).

Yue y Qiao (2008) observaron que la reducción de la concentración de PC de 23.1 a 17.2% disminuyó la altura de las vellosidades en duodeno y yeyuno; esto sugiere una disminución en el número de células de absorción del intestino delgado. Por consiguiente, estos cambios morfológicos podrían afectar además la capacidad de las vellosidades para producir transportadores de AA en el primero y segundo segmento del intestino delgado. Sin embargo, la expresión de  $b^{0,+}$  en íleon en el actual estudio no se afectó por el contenido de PC y, cabe destacar, que esto fue 3.4 y 14.1 veces mayor que lo observado en yeyuno de cerdos alimentados con la dieta BP-AA y la dieta AP, respectivamente (Figura 1). Estos

resultados pueden indicar que Lys cristalina en la dieta BP-AA se absorbió rápidamente en yeyuno mientras que la mayoría de la Lys liberada de las proteínas de trigo y pasta de soya de la dieta AP se absorbió en íleon a una velocidad lenta. En contraste, como se muestra en la figura 1, la expresión de CAT-1 en íleon fue 4.0 y 10.3 veces menor que en el yeyuno de cerdos alimentados con la dieta BP-AA y la dieta AP, respectivamente. Además, la expresión de  $b^{0,+}$  en hígado en cerdos alimentados con la dieta AP fue 4.6 veces mayor; no obstante la expresión de CAT-1 fue 6.6 veces menor en comparación con los cerdos alimentados con la dieta BP-AA. La expresión de transportadores de AA catiónicos, según los hallazgos de (Hatzoglou et al., 2004; Broer, 2008) representan su actividad funcional. Por consiguiente, las diferencias en la expresión de  $b^{0,+}$  y CAT-1 en yeyuno, íleon e hígado se dan para equilibrar la absorción diferencial de AA catiónicos a lo largo del intestino delgado, y su entrada para el hígado. Este balance aparente en la absorción de AA entre cerdos alimentados con la dieta BP-AA y la dieta AP, puede sugerir un proceso de adaptación que podría resultar en una fuente similar de aminoácidos esenciales para la síntesis de proteínas musculares.

## **2.7. Conclusiones**

La expresión de transportadores de AA catiónicos  $b^{0,+}$  y CAT-1 en cerdos en crecimiento con alimentación restringida parece estar afectada de diferente manera por la forma en que los AA son suministrados (libre o unidos a proteína) y por el tejido en estudio. Los AA libres provocan una mayor expresión de  $b^{0,+}$  en yeyuno pero bajo en hígado, independientemente de la fuente de AA, la expresión

de  $b^{0,+}$  es mayor en el íleon en comparación con yeyuno. Sin embargo, los efectos diferenciales de AA libres o unidos a proteína en la expresión de estos transportadores parecen ser balanceados por la respuesta diferencial de los dos segmentos del intestino delgado y el hígado. Suponiendo que la expresión de transportadores de AA catiónicos representan su actividad funcional, la absorción y utilización de estos aminoácidos puede ser similar en cerdos alimentados con la dieta BP-AA o con la dieta AP a base de trigo y pasta de soya. Los cerdos alimentados con la dieta AP tendieron a tener mejor rendimiento, pero el peso de la proteína de la canal, porcentaje de canal libre de grasa y el área del ojo del lomo no se afectaron, y su respuesta se asoció con la falta del efecto del nivel de PC en la dieta en la expresión de miosina. Otros estudios serían necesarios para justificar este aparente equilibrio en la absorción de AA y para determinar si la deficiencia de AA de cadena ramificada en la dieta BP-AA afecta su disponibilidad para el crecimiento muscular y la respuesta del rendimiento de los cerdos.

## **2.8. Literatura citada**

- AOAC, 2006. Official methods of analysis of AOAC. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA
- Barrera, M.A., Cervantes, M., Sauer, W.C., Araiza, A., Torrentera, N., Cervantes, M., 2004. Ileal amino acid digestibility and performance of growing pigs fed wheat-based diets supplemented with xylanase. *J. Anim. Sci.* 82, 1997-2003.
- Broer, S., 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev.* 88, 249–286.
- Brodsky, I.G., Suzara, D., Hornberger, T.A., Goldspink, P., Yarasheski, K.E., Smith, S., Kukowski, J., Esser, K., Bednoet, S., 2004. Isoenergetic Dietary Protein Restriction Decreases Myosin Heavy Chain IIx Fraction and Myosin Heavy Chain Production in Humans. *J. Nutr.* 134, 328–334.
- Brudevold, A.B., Southern, L.L., 1994. Low-protein crystalline amino acid-supplemented, sorghum-soybean meal diets for the 10- to 20-kilogram pigs. *J. Anim. Sci.* 1994. 72, 638-647.
- Czerwinski, M., Martin, J.M., 1994. Effect of Somatotropin on Myosin Expression in Pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 1204-1208
- 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.
- Hansen, J.A., Knabe, D.A., Burgoon, K.B., 1993. Amino acid supplementation of low-protein sorghum-soybean meal diets for 20- to 50-kilogram swine. *J. Anim. Sci.* 71, 442.
- Hatzoglou, M., Fernandez, J., Yaman, I., Closs, E., 2004. Regulation of cationic amino acid transport: The story of the CAT-1 transporter. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 377–99.
- Kerr, B.J., Southern, L.L., Bidner, T.D., Friesen K.G., Easter, R.A., 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.
- Kilberg, M.S., Pan, Y.X., Chen, H., Leung-Pineda, V., 2005. Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 59–85.
- Kobayashi, H., Børsheim, E., Anthony, T.G., Traber, D.L., Badalamenti, J., Kimball, S.R., Jefferson, L.S., Wolfe, R.R., 2003. Reduced amino acid availability inhibits muscle protein synthesis and decreases activity of initiation factor eIF2B. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E488-98.
- Kloareg, M., Noblet, J., Van Milgen, J., 2006. Estimation of whole body lipid mass in finishing pigs. *Anim. Sci.* 82, 241-251.
- Knowles, T.A., Southern, L.L., Bidner, T.D., Kerr, B.J., Friesen K.G., 1998. Effect of dietary fiber or fat in low-crude protein, crystalline amino acid-supplemented diets for finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 76, 2818–2832.
- Le Bellego, L., van Milgen, J., Noblet J., 2002. Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 80, 691–701.
- Lefaucheur, L., Ecolan, P., Plantard, L., Gueguen, N., 2002. New Insights into Muscle Fiber Types in the Pig. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 719-730
- Liao, S.F., Vanzant, E.S., Harmon, D.L., McLeod, K.R., Boling, J.A., Matthews, J.C., 2009. Ruminant 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.
- Majumder, M., Yaman, I., Gaccioli, F., Zeenko, V.V., Wang, C., Caprara, M.G., Venema, R.C., Komar, A.A., Snider, M.D., Hatzoglou, M., 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.
- Méndez, V., Avelar, E., Morales, A., Cervantes, M., Araiza, A., González, D., 2011. A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genet. Mol. Res.* 10, 3251-3255.

- Miyazaki, M., Esser, K.A., 2009. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J. Appl. Physiol.* 106, 1367-73.
- Morales, A., Barrera, M.A., Araiza, A.B., Zijlstra, R.T., Bernal, H., Cervantes, M., 2011. 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.* DOI: 10.1111/j.1439-0396.2011.01266.x
- Nieto, N., Lara, L., García, M.A., Vílchez, M.A., Aguilera, J.F., 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., Fortune, H., Shi, H.S., Dubois, S., 1994. Prediction of net energy value of feeds for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 344–354.
- Nolles, J.A., Verreijen, A.M., Koopmanschap, R.E., Verstegen, M.W.A., Schreurs, V.V.A.M., 2009. Postprandial oxidative losses of free and protein-bound amino acids in the diet: interactions and adaptation. *Arch. Anim. Nutr.* 93, 431-438.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ochoa MLI. ed. Diario Oficial de la Federación. México (DF), México.
- NRC, 1998. Nutrient Requirements of Pigs, Ninth Revised Edition. National Academy Press, Washington, D.C.
- Palacin, M., Borsani, G., Sebastio, G., 2001. The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 11, 328–335.
- Rerat, A., Simous-Nunes, C., Mendy, F., Vaissade, P., Vaugelade, P., 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
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Silk, D.B., Grimble, G.K., Rees, R.G., 1985. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proc. Nutr. Soc.* 44, 63–72.

- Torras-Llort, M., Torrents, D., Soriano-García, J.F., Gelpí, J.L., Estévez, R., Ferrer, R., Palacín, M., Moretó, M., 2001. Sequential Amino Acid Exchange across  $b^{0,+}$ -like System in Chicken Brush Border Jejunum. *J. Memb. Biol.* 180, 213–222.
- Tuitoek, J.K., Young, L.G., de Lange, C.F.M., 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.
- Yue, L.Y., Qiao, S.Y., 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. *Livestock Sci.* 115, 144–152.

### **III. Conclusiones generales**

En el estudio sobre el uso de pasta de canola en dietas para cerdos en finalización, el procesamiento de la pasta de canola tuvo un efecto positivo en su calidad nutricional. La PCEF posee mayor contenido de aceite residual y por tanto de EN, en comparación con PCEV, por tanto, es una fuente importante de energía. PCEF también posee un bajo contenido de fibra, glucosinolatos y alto DIE de lisina, a pesar de que su contenido de PC es menor en comparación con PCEV. Como resultado de este estudio, y por su contenido de aminoácidos digestibles y energía, se recomienda el uso de pastas de canola, para la formulación de dietas para cerdos. Sin embargo, debido a la variación en la calidad y características de la pasta de canola derivada de diferentes plantas, será necesario realizar nuevos estudios a fin de estandarizar sus características y mejorar su aprovechamiento.

En el segundo estudio, el uso de dietas bajas en proteína suplementadas con aminoácidos libres para alimentar cerdos no afectó su rendimiento productivo ni características de la canal, en comparación con cerdos alimentados con dietas altas en proteína que contienen únicamente AA unidos a proteína. Este hecho explica por qué tampoco se observaron diferencias en la expresión de miosina independientemente del nivel de proteína en las dietas. Por otro lado, la expresión de transportadores de AA a lo largo del intestino delgado fue diferente dependiendo de la forma en que éstos fueron proporcionados en la dieta, AA cristalinos o AA unidos a proteína; como ambas dietas cubrían los requerimientos de AA de los cerdos, es probable que éstos hayan adaptado la expresión de sus transportadores a lo largo del intestino para hacer más eficiente su absorción, y

por ende su utilización en la síntesis de proteínas. Para corroborar este hecho es necesario realizar más estudios sobre la absorción de AA cristalinos en comparación de los AA unidos a proteína y su relación con la síntesis de proteína muscular.

Algunas alternativas de alimentación en la producción porcina como, formular dietas bajas en proteína (11.1%) adicionadas con L-lisina, L-treonina y DL-metionina o utilizar pasta de canola como fuente de proteína y energía podrían disminuir la inclusión de ingredientes típicos en la formulación de dietas y reducir los costos en la alimentación porcina.