

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**Instituto de Ciencias Agrícolas**

**Instituto en Investigaciones en Ciencias Veterinarias**



**EFFECTO DE LA ALIMENTACION CON DIETAS BAJAS EN  
PROTEINA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA, EXPRESION  
DE TRANSPORTADORES DE AMINOACIDOS Y  
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO EN CERDOS**

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA**

**LORENZO BUENABAD CARRASCO**

**DIRECTOR**

**Dr. MIGUEL CERVANTES RAMIREZ**

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

NOVIEMBRE, 2015

La presente tesis “**Efecto de la alimentación con dietas bajas en proteína sobre la actividad enzimática, expresión de transportadores de aminoácidos y comportamiento productivo en cerdos**” realizada por el **C. Lorenzo Buenabad Carrasco**, dirigido por el **Dr. Miguel Cervantes Ramírez**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

## **Doctor en Ciencias Agropecuarias**

Comité Particular

---

Dr. Miguel Cervantes Ramírez  
Director de Tesis

---

Dra. Adriana Morales Trejo  
Secretario

---

Dr. Benedicto A. Araiza Pina  
Sinodal

---

Dr. Ernesto Avelar Lozano  
Sinodal

---

Dr. Alejandro Plascencia Jorquera  
Sinodal

## **AGRADECIMENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su financiamiento económico para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

A la Universidad Autónoma de Baja California y al Instituto de Ciencias Agrícolas por permitirme realizar mis estudios de doctorado.

Al Dr. Miguel Cervantes Ramírez por su apoyo en la dirección y asesoría del presente trabajo de investigación, así como por la confianza, amistad y facilidades prestadas durante mi estancia en esta institución.

A la Dra. Adriana Morales Trejo, por sus atinadas observaciones y sugerencias en la redacción del presente documento.

Al Dr. Benedicto A. Araiza Piña, por la revisión y sugerencias en la escritura del presente trabajo.

Al Dr. Ernesto Avelar Lozano, por su apoyo en la revisión de la redacción.

Al Dr. Alejandro Plascencia Jorquera, por las sugerencias realizadas al presente documento

A los compañeros alumnos, por su apoyo y amistad

## **DEDICATORIA**

- A mis padres: Ramón José Buenabad Castillo y Carmen Emelia Carrasco Castañeda, por su gran amor y apoyo incondicional durante toda mi vida.
- A mis hermanos y hermanas por su gran cariño.
- A mi esposa Lupita por su amor y compañía durante todos estos años.
- A mis hijos Gerardo, Ricardo, y Ramón que con su inocente imaginación me han alegrado cada uno de mis días.

## CONTENIDO

Comité particular .....	i
Agradecimientos.....	ii
Dedicatoria .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de cuadros .....	vi
Índice de figuras .....	vii
Lista de abreviaturas .....	viii
Resumen general .....	x
General abstract .....	xi
1.- Introducción general.....	1
2.- Revisión de literatura.....	4
2.1.- Digestión de proteínas y absorción de aminoácidos .....	4
2.2.- Nivel de proteína en la dieta y la actividad enzimática pancreática .....	5
2.3.- Absorción de aminoácidos .....	6
2.4.- Sistemas de transporte de aminoácidos en el enterocito .....	6
2.5.- Nivel aminoácidos en la dieta y la expresión de trasportadores de aminoácidos en intestino.....	8
2.6.- Comportamiento productivo .....	11
2.7.- Concentración de aminoácidos en suero .....	13
3.- Artículos .....	14
3.1.- El nivel de proteína y aminoácidos libres en la dieta afecta la actividad enzimática pancreática, expresión de trasportadores y concentración de aminoácidos en suero de cerdos en iniciación.....	14

3.1.1.- Resumen .....	14
3.1.2.- Abstract.....	15
3.1.3.- Introducción .....	16
3.1.4.- Materiales y métodos.....	18
3.1.5.- Resultados.....	27
3.1.6.- Discusión .....	32
3.1.7.- Conclusión .....	36
3.2.- Dietas bajas en proteína adicionadas con aminoácidos libres: efecto en el comportamiento productivo, composición de la canal y concentración de aminoácidos en suero de cerdos en crecimiento .....	37
3.2.1.- Resumen .....	37
3.2.2.- Abstract.....	38
3.2.3.- Introducción .....	39
3.2.4.- Materiales y métodos.....	40
3.2.5.- Resultados.....	46
3.2.6.- Discusión .....	51
3.2.7.- Conclusión .....	55
4.- Conclusión general.....	56
Literatura citada.....	57

## ÍNDICE DE CUADROS

1.	Composición de las dietas experimentales (base tal como se ofrece).....	19
2.	Composición analizada de PC y AA de las dietas experimentales (base tal como se ofrece).....	21
3.	Oligonucleótidos para análisis de PCRq de adnc derivado del ARNm de transportadores de AA b <sup>0,+</sup> , y <sup>+L</sup> , B <sup>0</sup> y ARNr 18S de cerdo. ....	25
4.	Expresión de transportadores de AA en intestino delgado de cerdos en iniciación alimentados con la dieta BPAA o AP (unidades arbitrarias, proporción de moléculas del ARNm:ARNr 18S). ....	28
5.	Concentración post-prandial de AA libres (mg/100 ml) en cerdos en iniciación alimentados con la dieta BPAA o AP. ....	31
6.	Composición de las dietas experimentales (base tal como se ofrece).....	42
7.	Composición analizada de dietas experimentales .....	43
8.	Efecto del nivel de PC y la forma (libre o asociada a proteína) de inclusión de AA en las dietas trigo-pasta de soya sobre la GDP, CDA y relación ganancia:consumo. ....	46
9.	Peso final (kg) y contenido relativo (% del peso de la canal) de los componentes de la canal de los cerdos por tratamiento .....	48
10.	Efecto del tratamiento sobre la ganancia diaria de peso de los componentes de la canal, canal completa y acumulación diaria total de proteína en cerdos (g/d).....	49
11.	Efecto de los tratamientos sobre el peso de las vísceras de los cerdos .....	50
12.	Concentración sérica postprandial de AA libres (mg/100 ml) en cerdos en crecimiento alimentados con la dieta BPAA o AP.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Actividad de tripsina y quimotripsina en duodeno y yeyuno de cerdos alimentados con la dieta BPAA o AP. .... 27
2. Expresión de transportadores de aa  $b^{0,+}$  y  $B^0$  en duodeno (D), yeyuno (Y) e íleon (I) de cerdos en iniciación alimentados con la dieta BPAA o AP (unidades arbitrarias, proporción de moléculas del ARNm:ARNr 18S). .... 30



## LISTA DE ABREVIATURAS

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 neutros dependiente de sodio
b <sup>0+</sup> .-	Transportador de AA catiónicos y neutros independiente de sodio
BP.-	Baja en proteína
BPAA.-	Baja en proteína y adicionada con aminoácidos
BPAA+N.-	Baja en proteína y adicionada con AA más nitrógeno no esencial
CS.-	Concentración de AA en suero
dNTP.-	Deoxinucleósido trifosfato
Exp.-	Experimento
PC.-	Proteína cruda
PCR.-	Reacción en cadena de la polimerasa
PCRq.-	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
y <sup>+</sup> L.-	Transportador de aminoácidos catiónicos y neutros

Arg.-	Arginina
His.-	Histidina
Iso.-	Isoleucina
Leu.-	Leucina
Lis.-	Lisina
Met.-	Metionina
Fen.-	Fenilalanina
Tre.-	Treonina
Val.-	Valina
Ala.-	Alanina
Asn.-	Asparagina
Asp.-	Ácido Aspártico
Gln.-	Glutamina
Glu.-	Ácido Glutámico
Gli.-	Glicina
Pro.-	Prolina
Ser.-	Serina

## RESUMEN GENERAL

Se evaluó el efecto del nivel de proteína y aminoácidos (AA) libres en la dieta sobre la actividad enzimática pancreática, expresión de transportadores de AA, comportamiento productivo, características de la canal y concentración en suero (CS) de AA. Para este propósito se utilizaron 74 cerdos jóvenes bajo un diseño completamente al azar en tres experimentos independientes Exp. 1 y 2. Los tratamientos fueron: 1) Dieta baja en proteína (19.2 %) más AA libres (BPAA) y 2) Dieta alta en proteína (28.1%) sin AA libres (AP). Los cerdos alimentados con la dieta AP tuvieron una mayor actividad de tripsina y quimotripsina en duodeno y yeyuno ( $P < 0.001$ ). En general, la actividad de tripsina fue mayor en yeyuno que en duodeno ( $P < 0.05$ ). En la dietas BPAA, la expresión de  $b^{0,+}$  y  $B^0$  fue más alta en duodeno ( $P = 0.030$ ) e íleon ( $P = 0.011$ ), respectivamente. Para la dieta BPAA, la expresión de  $b^{0,+}$  en duodeno fue más alta que en yeyuno e íleon ( $P < 0.01$ ). En cerdos alimentados con la dieta AP, la expresión de  $b^{0,+}$  y  $B^0$  fueron más altas en duodeno y yeyuno comparado con íleon ( $P < 0.01$ ). La CS de Arg fue más alta ( $P = 0.011$ ) con la dieta AP, en cambio Lis ( $P < 0.049$ ), Met ( $P = 0.027$ ) y Tre ( $P = 0.037$ ) fueron más altos con la dieta BPAA. Exp. 3. Los tratamientos fueron: 1) Dieta baja en proteína (14%) suplementada con AA libres (BPAA); 2) como en BPAA mas una fuente de nitrógeno (BPAA+N); 3) Dieta con contenido de PC intermedio (16%) más AA (MPAA); y 4) Dieta alta en proteína (22%) (AP) sin AA libres. Se sacrificaron ocho cerdos del tratamiento BPAA y AP para coleccionar muestras sanguíneas y diseccionar la canal. No hubo diferencias entre tratamientos para GDP, CDA, relación ganancia: consumo. El peso de intestino delgado y riñón fueron mayores en cerdos que recibieron la dieta AP ( $P < 0.001$ ). La CS de Lis y Met fueron más bajos en cerdos alimentados con la dieta AP; por el contrario la CS de Arg, His, Iso, Leu, Fen, y Val fueron más altos el tratamiento AP ( $P < 0.05$ ). El nivel de proteína y la adición de AA libres modifican la actividad enzimática pancreática, la expresión de los transportadores de AA en intestino delgado y la CS de AA. Es factible reducir la PC hasta en ocho unidades porcentuales sin afectar el comportamiento productivo y componentes de la canal.

**Palabra clave:** Proteína cruda, comportamiento productivo, tripsina, quimotripsina, y expresión de genes

## GENERAL ABSTRACT

The aim was to evaluate dietary protein and amino acids (AA) level on pancreatic enzyme activity, expression of AA transporters, performance, carcasses quality, and serum concentration (CS) of AA. Seventy-four young pigs in a complete randomized design were used in three separated trails. Exp. 1 and 2. The dietary treatments: 1) low crude protein (PC) (19.2%) diet added with free AA (BPAA); and 2) high PC (28.1%) diet (AP) without free AA. Pigs fed the AP diet had greater activities of trypsin and chymotrypsin in duodenum and jejunum ( $P < 0.001$ ). Regardless of the dietary treatment, trypsin was higher in jejunum than in duodenum ( $P < 0.05$ ). Pigs fed the BPAA diet had higher  $b^{0,+}$  expression in duodenum ( $P = 0.030$ ). The expression of  $B^0$  in duodenum and jejunum were not affected by dietary treatment ( $P > 0.10$ ), however in ileum the expression was higher for pigs fed the diet BPAA ( $P < 0.011$ ). For pigs fed the BPAA diet, the expression of  $b^{0,+}$  in duodenum was higher than that in jejunum and ileum ( $P < 0.01$ ). For the AP diet, the expression of  $b^{0,+}$  and  $B^0$  were higher than that in ileum ( $P < 0.01$ ). The CS of Arg was higher ( $P = 0.011$ ) in pigs fed the AP diet, however the CS of Lys ( $P < 0.049$ ), Met ( $P = 0.027$ ), and Thr ( $P = 0.037$ ) were higher in pigs fed the BPAA diet. Exp. 3. The dietary treatments: 1) low-CP (14%) diet supplemented with free AA (BPAA); 2) as in the BPAA added with non-essential nitrogen source (BPAA+N); 3) intermediate PC level content (16%) added with free AA (MPAA); and 4) high PC (22%) diet (AP) without free AA. At the end of the experiment, eight pigs from BPAA and AP were sacrificed to dissect the carcasses and collect blood samples. There were not differences in GDP, CDA, gain: feed proportion, weights of carcass components and some visceral organs between treatments. Weights of the large intestine and kidney were higher in AP pigs ( $P < 0.01$ ). The CS of Lys and Met were lower in pigs fed the AP diet; however the CS of Arg, His, Ile, Leu, Phe, and Val was higher for this dietary treatment ( $P < 0.05$ ). The protein and crystalline AA level modifies the pancreatic enzyme activity, the expression of AA transporters in the small intestine and the post-prandial CS of free AA in pigs. The use of free AA allows to substitute up to eight percentage units of protein in the diets without affecting pig performance.

**Key words:** Crude protein, growth performance, trypsin, chymotrypsin, and gene expression

## 1.- INTRODUCCIÓN GENERAL

Los costos de alimentación en producción porcina rebasan el 70% de los costos de producción, por lo que un pequeño cambio en este rubro tiene un impacto importante en la rentabilidad de la producción de cerdos (Wood *et al.*, 2013). Una estrategia para disminuir los costos de producción y la contaminación de los cuerpos de agua es la reducción del nivel de proteína en la dieta acompañado de la suplementación de aminoácidos cristalinos (Garcia-Launay *et al.*, 2014). En estas condiciones, es factible mantener el comportamiento productivo de los cerdos a un nivel aceptable (Prandini *et al.*, 2014); mejorar la utilización del nitrógeno siempre que se cubran los requerimientos de aminoácidos en la dieta (Gloaguen *et al.*, 2014); así como reducir la excreción de nitrógeno al ambiente (NRC, 2012; He *et al.*, 2015; Madrid *et al.*, 2013).

Actualmente a nivel comercial se utiliza la suplementación de Lis, Tre, Trp, y Met con la finalidad de cubrir los requerimientos de los aminoácidos más limitantes para el crecimiento de cerdos en dietas a base de cereales-pasta de soya (Lewis, 2001). Figueroa *et al.* (2003) demostraron que es factible la reducción del nivel de la proteína en cuatro unidades porcentuales sin afectar el comportamiento productivo. Sin embargo, la reducción de proteína más allá de este nivel está limitada por el conocimiento de los aminoácidos que se vuelven limitantes después de suplementar Lis, Tre, Trp y Met (Gloaguen *et al.*, 2014). Los resultados de comportamiento productivo de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína han sido inconsistentes. Estudios recientes en cerdos en iniciación reportaron que la reducción del nivel de proteína en la dieta disminuye el comportamiento productivo (He *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Respecto a la calidad de la canal, la reducción de proteína en la dieta

incrementa el contenido de grasa en la canal cuando el nivel de proteína se reduce cuatro o más unidades porcentuales (Tuitoek *et al.*, 1997; Yue y Quiao, 2008).

El nivel de proteína (Morrisset y Dunnigan, 1971; He *et al.*, 2013) y la forma (Schneeman *et al.*, 1977) en que esta se adiciona a la dieta modifica la actividad secretora del páncreas. Se considera que esta modificación es una respuesta fisiológica de retroalimentación positiva al nivel de proteína en la dieta (Green *et al.*, 1973). Sin embargo, la regulación de la actividad secretora exocrina del páncreas y los mecanismos involucrados no han sido completamente elucidados (Pierzynowski *et al.*, 2007). Kinouchi *et al.* (2012) demostraron los efectos detrimentales que tiene la falta de proteína en la dieta de ratas destetadas en el periodo de lactancia sobre el desarrollo de las funciones exocrinas del páncreas. De acuerdo con estos autores, la falta de desarrollo del tejido pancreático y de la actividad secretora exocrina puede tener efectos nocivos de forma duradera. Por tanto, es razonable suponer que el uso de dietas bajas en proteína en la alimentación de cerdos puede afectar la actividad exocrina del páncreas.

Por otra parte, se conoce que la absorción de péptidos y aminoácidos en intestino esta mediada por sus respectivos transportadores (Closs *et al.*, 2006). A su vez, la abundancia de estos transportadores puede estar regulada por la concentración de los sustratos. Algunos estudios muestran que la reducción del consumo de proteína, puede incrementar la expresión de algunos transportadores de péptidos o aminoácidos (Zhang *et al.*, 2013), como una medida de incrementar la eficiencia de absorción de los mismos. De manera específica, la adición de Lis libre en la dieta en cerdos incrementa el ARNm que codifica los transportadores de aminoácidos  $b^{0,+}$ ,  $y^+ L$  y CAT-1 (He *et al.*,

2013). En contraste, Wu *et al.* (2015) reportaron una reducción de la expresión de los transportadores de aminoácidos cuando los cerdos fueron alimentados con dietas muy bajas en proteína. En la actualidad existe limitada información sobre la expresión de transportadores de aminoácidos en intestino delgado de cerdos (Wang *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2015).

Se condujeron tres experimentos con la finalidad de evaluar el efecto del nivel de proteína y la adición de aminoácidos libres en la dieta de cerdos jóvenes sobre la actividad enzimática de tripsina y quimotripsina, y expresión de los transportadores de aminoácidos en intestino delgado (Exp. 1 y 2). También se determinó el efecto que tienen este tipo de dietas sobre el comportamiento productivo y características de la canal de los cerdos en crecimiento (Exp. 2). En todos los experimentos se determinó la concentración de aminoácidos en suero como un indicador de absorción y utilización de los aminoácidos por los cerdos.

## 2.- REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1.- DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS Y ABSORCIÓN DE AMINOÁCIDOS

Las necesidades de aminoácidos en los animales son cubiertas por medio de la asimilación de aminoácidos libres y pequeños péptidos en el intestino delgado. Este proceso involucra la digestión de las proteínas y la subsecuente absorción de los aminoácidos y pequeños péptidos por parte del enterocito (Goodman, 2011). La digestión de proteínas inicia en el estómago bajo la acción de las proteasas gástricas y el ácido clorhídrico. Siendo pepsina la principal enzima hidrolítica en el estómago de cerdos en crecimiento y adultos (Yen, 2001). Cuando el quimo ingresa al intestino delgado, las enzimas proteasas pancreáticas continúan la digestión de las proteínas. Las enzimas proteasas incluyen un grupo de endopeptidasas tales como tripsina, quimotripsina, y elastasa, además de las exopeptidasas carboxipeptidasa A y B (Ganapathy, 2012). Los productos de la digestión llevada a cabo por las proteasas está constituido de aproximadamente entre 25-30% aminoácidos libres y 70-75% de oligopéptidos (Goodman, 2011; Yen, 2001). Los oligopéptidos de más de 3 aminoácidos son hidrolizados en la luz intestinal mediante las peptidasas de la región apical del enterocito (Emery, 2012). Los aminoácidos libres y péptidos pequeños son transportados hacia el interior del enterocito a través de sistemas de transporte específicos en la región apical del enterocito. Una vez dentro de las células los péptidos son sujetos a hidrólisis por las peptidasas citoplasmáticas generando aminoácidos libres.



## 2.2.- NIVEL DE PROTEÍNA EN LA DIETA Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PANCREÁTICA

El intestino delgado es el sitio primario de digestión y absorción de nutrientes provenientes de la dieta, específicamente en duodeno donde la digesta proveniente del estómago se mezcla con las secreciones del intestino, hígado, y páncreas (Yen, 2001). Esta ampliamente documentado que la producción y secreción de las enzimas digestivas responde a los cambios en la composición de los macronutrientes en la dieta (Morriset y Dunigan, 1971; Vallete *et al.*, 1992; Baumler *et al.*, 2010;). La secreción de las enzimas proteolíticas pancreáticas y su actividad son estimuladas por el nivel de proteína en la dieta en diferentes especies de mamíferos (Morriset y Dunnigan, 1971; Green *et al.*, 1973; Partridge *et al.*, 1982; He *et al.*, 2013). El incremento en los niveles de proteína en la dieta de pollos de engorda estuvo asociado al incremento en la secreción de enzimas proteolíticas pancreáticas y el tamaño del páncreas (Imondi y Bird, 1967). Por otra parte la disminución o eliminación de la proteína en la dieta disminuye la actividad proteolítica en pollos de engorda (Imondi y Bird, 1967) así como el tamaño del páncreas en ratas (Baumler *et al.*, 2010). El tipo de proteína también afecta la síntesis de enzimas proteolíticas, Schneeman *et al.*, (1977) utilizando dietas con caseína hidrolizada y sin hidrolizar demostraron que la caseína hidrolizada no fue capaz de estimular la síntesis de enzimas proteolíticas. Por otra parte, la inclusión de aminoácidos libres en la dieta tampoco estimularon las síntesis de enzimática proteolíticas pancreáticas (Schneeman *et al.*, 1977; Baumler *et al.*, 2010). Los cambios adaptativos en la tasa de síntesis de quimotripsinógeno y tripsinógeno ocurren rápidamente después de un cambio en el nivel de proteína o la forma en la cual es

adicionada. Dagon y Lohaie (1981) demostraron que los cambios en la síntesis de quimotripsinógeno y tripsinógeno puede ser modulado tan pronto como dos horas después de iniciado el cambio en el tipo de dieta, seguido por un cambio en la composición del contenido pancreático cuatro horas después de la estimulación por el cambio en alimentación; de esta manera, 24 h después de iniciados los cambios en la alimentación, encontraron diferencias importantes en la tasa de síntesis y concentración de enzimas pancreáticas.

### 2.3.- ABSORCIÓN DE AMINOÁCIDOS

El intestino delgado es el sitio principal de la absorción de aminoácidos y pequeños péptidos. Estos son transportados a través del epitelio intestinal por medio de varios sistemas de transporte que tienen diferente expresión en la membrana apical y basolateral del enterocito (Palacin *et al.*, 1998). Los sistemas de transporte de aminoácidos se clasifican como dependientes (mayúsculas) e independientes (minúsculas) de  $\text{Na}^+$ . Además, a cada sistema se le adicionan los superíndices 0, +, -, y 0,+ para describir la naturaleza eléctrica de los aminoácidos reconocidos como sustrato para cada sistema (Bröer, 2008).

### 2.4.- SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EN EL ENTEROCITO

*Sistema B<sup>0</sup>*. Este es el principal sistema de transporte de aminoácidos neutros aislado a través de vesículas de la membrana apical del enterocito (Broer, 2008) y está caracterizado por ser de alta capacidad y dependiente de  $\text{Na}^+$  (Boudko *et al.*, 2005; Palacin *et al.*, 1998). B<sup>0</sup> se expresa en la región apical del intestino delgado y en las células del epitelio renal. Una ectopeptidasa conocida como enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) está asociada con B<sup>0</sup>; esta carboxipeptidasa se localiza en la

región apical del enterocito y es necesaria para el apropiado reclutamiento de  $B^0$  a la membrana apical. Además ACE2 hidroliza aminoácidos neutros a partir del carboxilo terminal de los péptidos presentes en el lumen del intestino y los aminoácidos liberados sirven como sustrato para  $B^0$  (Camargo *et al.*, 2009).

*Sistema  $b^{0+}$ .* Es el sistema de transporte de aminoácidos neutros y catiónicos con alta afinidad e independiente de  $Na^+$ , el cual se expresa en la membrana apical del intestino. Es el sistema principal para la absorción de aminoácidos catiónicos y cistina en intestino y riñón (Palacin *et al.*, 2001; Verrey *et al.*, 2004). El sistema  $b^{0+}$  funciona como un heterodímero que consiste de dos proteínas. La subunidad pesada de este sistema de transporte se conoce como relacionado al transportador de aminoácidos  $b^{0+}$  (rBAT), la cual no tiene funciones de transporte. La cadena ligera conocida como transportador de aminoácidos  $b^{0+}$  ( $b^{0+}$ ) posee las funciones de transporte. La función de rBAT es la formación de un heterodímero con  $b^{0+}AT$  durante la biogénesis vía un enlace cruzado disulfuro y facilitar el tráfico del heterodímero en la membrana del borde de cepillo (Bröer, 2008). Una característica de este sistema es que funciona a través del intercambio obligatorio de aminoácidos. Bajo condiciones fisiológicas, este media la entrada de aminoácidos catiónicos y cistina al enterocito los cuales intercambia por aminoácidos neutros.

*Sistemas  $y^+L$ .* Este sistema de transporte de la membrana basolateral regula la entrada de aminoácidos neutros del torrente sanguíneo hacia el enterocito en una reacción dependiente de  $Na^+$ . También regula la salida de aminoácidos catiónicos de la célula en una reacción no dependiente de  $Na^+$  (Palacin *et al.*, 2001; Broer, 2008). El sistema  $y^+L$  intercambia aminoácidos de manera obligatoria y que comprende de dos

isoformas, cada una funcionando como heterodímero. La subunidad pesada es 4F2hc. Las subunidades ligeras son conocidas como transportador de aminoácido y<sup>+</sup>L 1 y y<sup>+</sup>L 2, las cuales exhiben actividad transportadora (Pfeiffer *et al.*, 1999).

## 2.5.- NIVEL AMINOÁCIDOS EN LA DIETA Y LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EN INTESTINO

El transporte de aminoácidos libres (no péptidos) a través de la membrana apical o basolateral depende de las proteínas de transporte y de la actividad de las mismas (Liao *et al.*, 2009). La absorción y transporte de aminoácidos es un proceso fisiológico complejo influenciado por muchos factores (He *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013) incluyendo el nivel de proteína en la dieta y el balance de aminoácidos. Wu *et al.* (2015) reportaron que una excesiva reducción del nivel de la proteína en la dieta con la adición de aminoácidos resultó en una reducción importante en la expresión de los genes que codifican para proteínas transportadoras de aminoácidos en yeyuno. Mientras que Morales *et al.* (2015) encontraron un incremento en la expresión de los transportadores de aminoácidos cuando se redujo el nivel de proteína en la dieta acoplado con la adición de aminoácidos (AA). Liao *et al.* (2009) concluyeron que el aumento en el suministro luminal de AA redujo la capacidad de transporte por la membrana apical y basolateral.

Transportador de aminoácido b<sup>0+</sup>. Los resultados de expresión de este transportador de aminoácidos son contradictorios entre sí, por una parte Torras-Llort *et al.* (1998) encontró que una alta concentración de lisina en el lumen intestinal en pollos de engorda incrementó la absorción de lisina y se especuló que se debe al aumento de la expresión de los transportadores. De manera similar Morales *et al.* (2015) reportaron

un incremento en la expresión de  $b^{0+}$  cuando suplementaron lisina en forma libre. Sin embargo, Liao *et al.* (2009) demostró que el incremento en el suministro de aminoácidos catiónicos al flujo duodenal, no afectó la expresión de ARNm de  $b^{0+}$ . Por otra parte los niveles de ARNm de transportador de aminoácidos  $b^{0+}$  fue mayor cuando se suplementó lisina en forma libre a una dieta con base en ceína (He *et al.*, 2013). Wang *et al.* (2012) reportaron una mayor abundancia de ARNm del transportador de aminoácidos catiónicos  $b^{0+}$  en yeyuno cuando los cerdos fueron alimentados con niveles medios de lisina cristalina. Zhang *et al.* (2013) no encontraron diferencias en la expresión utilizando diferentes niveles de proteína en la dieta y la adición de aminoácidos de cadena ramificada en cerdos. Morales *et al.* (2013) reportaron que la suplementación de leucina en la dieta redujo la expresión de  $b^{0+}$  en yeyuno, sin embargo la adición de lisina no modificó la expresión. Cevantes-Ramirez *et al.* (2013) reportaron que la suplementación de Leu e Iso solas o en combinación redujo la expresión de  $b^{0+}$ . García-Villalobos *et al.* (2012) reportaron que la adición de Lis, Tre y Met en forma libre a una dieta deficiente en aminoácidos, incrementó la expresión de  $b^{0+}$  en yeyuno.

Transportador de aminoácido  $y^+L$ . Wu *et al.* (2015) encontraron que la reducción del nivel de proteína en la dieta no afectó la expresión del gen que codifica para el transportador de aminoácidos  $y^+L$ . Bajo condiciones de estrés nutricional la expresión de algunos transportadores de aminoácidos pudiera incrementarse para mantener un crecimiento normal de los animales bajo condiciones adversas (He *et al.*, 2013). Mientras que Liao *et al.* (2009) encontraron que el incremento en el nivel de proteína microbial en el flujo duodenal redujo el contenido de RNAm de  $y^+L$  2 y 4F2hc, lo cual

implica que el incremento en el suministro de aminoácidos catiónicos en el flujo duodenal de becerros disminuyó la capacidad de absorción mediada por el sistema  $y^+L$ . Esta disminución de la expresión potencialmente pudiera reducir la absorción de aminoácidos que se encuentran en exceso y con ello evitar el costo energético (o toxicidad) por el metabolismo del exceso de aminoácidos. Sin embargo la expresión de  $y^+L$  1 no fue afectada. Por el contrario He *et al.* (2013) demostraron que la suplementación de lisina incremento los niveles de ARNm de transportador de aminoácidos  $y^+L$ . Wang *et al.* (2012) reportaron que diferentes niveles de lisina en la dieta de cerdos no afecto la abundancia del ARNm del transportador  $y^+L$  en intestino delgado. Zhang *et al.* (2013) no encontraron diferencias en la expresión utilizando diferentes niveles de proteína en la dieta en cerdos.

Transportador de aminoácido  $B^0$ . Los estudios de Zangh *et al.* (2013) demostraron que ni el nivel de proteína en la dieta ni la adición de aminoácidos de cadena ramificada modificaron la cantidad de ARNm de  $B^0$ . Por el contrario Wu *et al.* (2015) encontraron que la reducción del nivel de proteína en la dieta redujo la expresión del gen que codifica para el trasportador de aminoácidos  $B^0$ . Yang *et al.* (2012) reportaron que la expresión del gen que codifica para la proteína  $B^0$  fue menor en cerdos miniatura y estuvo asociado al bajo peso al nacimiento. El exceso de Leu, Iso, y Val en cerdos incremento la expresión  $B^0$  en yeyuno y tuvo una tendencia a incrementar en íleon (Cervantes *et al.*, 2015), por el contrario Morales *et al.* (2015) no reportaron diferencias en expresión de  $B^0$  entre cerdos alimentados con dietas altas o bajas en proteína. Los niveles de ARNm de las proteínas que codifican para  $B^0$  se incrementaron con la suplementación de L-Leu en lechones lactantes de una semana de edad (Sun *et*

*al.*, 2015). En resumen, el exceso, deficiencia o desbalances de aminoácidos en la dietas puede incrementar o disminuir la expresión de genes que codifican para el transportador de su respectiva proteína, sin embargo no se han definido todos los mecanismos que regulan este proceso (Wang *et al.*, 2012)

## 2.6.- COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO

La reducción de más de cuatro unidades porcentuales en el nivel de proteína en la dieta para cerdos se ve reflejada en la reducción de la GDP, eficiencia alimenticia y la retención de nitrógeno (Zervas y Zijlstra, 2002). La reducción del nivel de proteína en la dieta también está asociada a una tendencia en el incremento de la acumulación de grasa en los cerdos (Kerr *et al.*, 1995; Figueroa *et al.*, 2002). Esta acumulación de grasa pudiera deberse a que otros aminoácidos se conviertan en limitantes cuando hay un reducción substancial en el nivel de proteína (Tuitoek *et al.*, 1997). Debido a las discrepancias en los resultados de comportamiento productivo, Opapeju *et al.* (2008) aseveraron que esta diferencia está influenciada en parte por la etapa fisiológica de los animales.

Etapa de iniciación. El uso de dietas bajas en proteína cruda fortificadas con aminoácidos en la alimentación de cerdos jóvenes ha mostrado resultados muy variados en el comportamiento productivo. Por una lado Gloagluen *et al.* (2014) concluyeron que es factible formular dietas muy bajas en proteína para cerdos siempre y cuando se cubran los requerimientos de los aminoácidos. En este sentido Le Bellego *et al.* (2002) reportaron que es factible reducir hasta en 5.5 unidades porcentuales el nivel de proteína cuando se adicionan aminoácidos libres. Por su parte Nemecheck *et al.* (2014) no encontraron diferencias en comportamiento productivo entre cerdos

alimentados con dietas bajas en proteína base cereal-pasta de soya vs dieta control. Otros resultados indican que la reducción de proteína acoplado con la adición de aminoácidos mejoró la eficiencia alimenticia de los cerdos (Jones *et al.*, 2014).

Sin embargo una reducción del nivel de proteína en la dietas de más allá del 13.3% PC: Lis digestible estandarizada condujo a una reducción del comportamiento productivo (Gloaguen *et al.*, 2014). Otros estudios mostraron que el uso de dietas bajas en proteína fortificadas con aminoácidos libres tuvieron un comportamiento productivo pobre (Opapeju *et al.*, 2008) debido a una disminución en la acumulación de proteína muscular (Deng *et al.*, 2009). Esto se debe en parte debido a que la alimentación con dietas bajas en proteína por largos periodos de tiempo suprime parcialmente las vías de señalización de mTOR (Deng *et al.*, 2009).

Etapas de crecimiento y finalización. Estudios recientes han demostrado que la adición de aminoácidos libres a dietas para cerdos en crecimiento utilizando dietas base cereal-pasta de soya fueron capaces de restablecer o mantener el comportamiento productivo similar a la mostrada por los cerdos alimentados con la dieta control (Powell *et al.*, 2011). Cabe mencionar que la reducción del nivel de proteína en la dieta acoplado con la adición de aminoácidos no afectó la composición de la canal de los cerdos cuando se comparó con el control en la etapa de crecimiento (Morales *et al.*, 2015) y finalización (Gallo *et al.*, 2015)

Sin embargo otros estudios muestran que el uso de dietas bajas en proteína sin el adecuado suministro de aminoácidos esenciales en cantidades óptimas (Lambe *et al.*, 2013) generó una disminución en el comportamiento productivo y la acumulación de proteína muscular (Deng *et al.*, (2007). Además, la reducción del nivel de proteína



también estuvo asociada a un incremento en la cantidad de grasa en la canal y grasa intramuscular (Wang *et al.*, 2012). Lo anterior fue atribuido al incremento en la expresión de genes lipogénicos y la reducción en la expresión de genes lipolíticos (Wang *et al.*, 2012) en esta etapa fisiológica.

## 2.7.- CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN SUERO

Los aminoácidos están directa e indirectamente relacionados unos con otros dentro de las vías metabólicas de los nutrientes y por tanto la concentración de aminoácidos en plasma refleja la suma total del flujo metabólico de todos los órganos y tejidos (Shikata *et al.*, 2007). La absorción de aminoácidos está influenciada por la forma en que se adicionan estos a la dieta. Esto fue demostrado cuando se comparó la concentración en suero de aminoácidos de cerdos alimentados con una dieta baja en proteína adicionada con aminoácidos libres vs con una dieta con aminoácidos asociados a proteína. El pico de la concentración portal y arterial de Lis y Tre se alcanzó a 1.0 y 2.5 h posprandial respectivamente; de manera similar la absorción neta portal alcanzó su pico a 0.5 y 2.5 h posprandial, respectivamente (Yen *et al.*, 2004). Por otra parte, Rojas-García y Rønnestad, (2003) evaluaron la alimentación con aminoácidos libres, péptidos, y proteína intacta encontrando que los aminoácidos libres se absorbieron aproximadamente ocho veces más rápido que la proteína intacta y seis veces más rápido que los péptidos. En cuanto a la tasa de asimilación, los AA libres tuvieron una mayor eficiencia de asimilación (90%) que los péptidos (12%) y proteínas (32%). En concordancia con los datos anteriores, Morales *et al.* (2015) demostraron que la concentración en suero postprandial de aminoácidos de cerdos en crecimiento refleja la forma en la cual éstos son incluidos en la dieta (libres o asociados a proteína).

### 3.- ARTÍCULOS

3.1.- El nivel de proteína y aminoácidos libres en la dieta afecta la actividad enzimática pancreática, expresión de transportadores y concentración de aminoácidos en suero de cerdos en iniciación.

#### 3.1.1.- RESUMEN

Se utilizaron 26 cerdos bajo un diseño completamente al azar en dos experimentos independientes (17.2 y 12.7 kg de peso inicial, respectivamente). Los cerdos fueron asignados aleatoriamente a los tratamientos para evaluar el nivel de proteína y aminoácidos (AA) libres en la dieta sobre la actividad enzimática pancreática, expresión de transportadores y concentración en suero (CS) de AA. Los tratamientos: 1) Dieta baja en proteína (19.2 %) adicionada con AA libres (BPAA) y 2) Dieta alta en proteína (28.1%) sin AA libres (AP). Al final de la prueba los cerdos se sacrificaron y se tomó muestras de sangre, digesta y mucosa del intestino delgado. La alimentación con la dieta AP tuvo mayor actividad de tripsina y quimotripsina en duodeno y yeyuno de cerdos ( $P < 0.001$ ), e independientemente del tipo de dieta, la actividad de tripsina fue mayor en yeyuno que en duodeno ( $P < 0.05$ ). Con la dieta BPAA se obtuvo mayor expresión de  $b^{0,+}$  y  $B^0$  en duodeno ( $P = 0.030$ ) e íleon ( $P = 0.011$ ), respectivamente. La expresión de  $y^+L$  en duodeno tendió a ser más alta con la dieta BPAA ( $P = 0.098$ ). Independientemente de la dieta, la expresión de  $b^{0,+}$  fue mayor en duodeno y yeyuno ( $P < 0.01$ ). La CS de Lis, Met y Tre fueron más altos ( $P < 0.05$ ) con la dieta BPAA. Los resultados indican que el nivel de proteína y AA libres modifican la actividad enzimática pancreática, expresión de los transportadores y nivel de AA en suero de cerdos jóvenes.

**Palabras clave:** Proteína cruda, Tripsina, quimotripsina, y expresión de genes

### 3.1.2.- ABSTRACT

Twenty-six nursery pigs in a complete randomized design were used in two separated trails (17.2 and 12.7 kg, initial BW); pigs were randomly assigned to treatments to evaluate dietary protein and amino acids (AA) level on pancreatic enzyme activity, expression of AA transporters, and serum concentration (CS) of AA. The dietary treatments were: 1) low crude protein (19.2%) diet supplemented with free AA (BPAA); and 2) high crude protein (28.1%) diet (AP) without free AA. The pigs were sacrificed by electrical stunning and exsanguination. Blood samples, digesta and mucosal samples were taken from the small intestine for further analysis. Pigs fed the AP diet had greater activities of trypsin and chymotrypsin in duodenum and jejunum ( $P < 0.001$ ); regardless of the dietary treatment, trypsin was higher in jejunum than in duodenum ( $P < 0.05$ ). Pigs fed the BPAA diets had higher  $b^{0,+}$  and  $B^0$  expression in duodenum ( $P = 0.030$ ) and ileum ( $P < 0.011$ ) respectively. Feeding pigs the BPAA diet, tend to increase the  $y^+L$  expression in duodenum ( $P = 0.098$ ). To compare the effect of expression between intestinal segments, for pigs fed the BPAA diet the expression of  $b^{0,+}$  in duodenum was higher than that in jejunum and ileum ( $P < 0.01$ ). For the AP diet, the expression of  $b^{0,+}$  and  $B^0$  were higher in duodenum and jejunum ( $P < 0.01$ ). The post-prandial CS for Lys ( $P < 0.049$ ), Met ( $P = 0.027$ ), and Thr ( $P = 0.037$ ) were higher in pigs fed the BPAA diet. The results suggest that the protein and free AA level modifies the pancreatic enzyme activity, the expression of AA transporters in the small intestine and the post-prandial serum concentration of free AA in nursery pigs.

**Key words:** Crude protein, trypsin, chymotrypsin, and gene expression

### 3.1.3.- INTRODUCCIÓN

El uso de dietas bajas en proteína cruda (PC) enriquecidas con aminoácidos para cerdos jóvenes empleando el concepto de proteína ideal (NRC, 2012; Gloaguen *et al.*, 2014) es una estrategia para aminorar los problemas de diarrea pos destete (Heo *et al.*, 2008). También ayuda a reducir la excreción de nitrógeno al ambiente (He *et al.*, 2015; Madrid *et al.*, 2013) al mismo tiempo puede reducir los costos de alimentación, por la reducción en el nivel de inclusión de la pasta de soya (Ren *et al.*, 2012; Gallo *et al.*, 2015).

Sin embargo, los resultados de comportamiento productivos utilizando dietas bajas en proteína en cerdos no han sido del todo consistentes. Por una parte, se reportó una disminución del comportamiento productivo en cerdos de iniciación (Opapeju *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2009; He *et al.*, 2015). Además que se comprometió el suministro de nitrógeno para la síntesis de AA esenciales en el caso de dietas con menos de 13.5 % de PC (Gloaguen *et al.*, 2014).

Es bien conocido que la mayor actividad digestiva se lleva a cabo en los segmentos intestinales duodeno y yeyuno (Asche *et al.*, 1989); en donde participa la función exocrina del páncreas sintetizando enzimas digestivas que son esenciales para la digestión y absorción de los carbohidratos, lípidos y proteínas de la dieta (Baumler *et al.*, 2010). La adaptación de la síntesis de enzimas pancreáticas a los cambios en la composición de la dieta también fue demostrada (Morriset y Dunningan, 1971; Schneeman *et al.*, 1977). De acuerdo con la teoría de la retroalimentación pancreática propuesta por Green *et al.* (1973), la proteína es un regulador de la secreción pancreática debido a que ésta es sustrato de tripsina y quimotripsina.

El intestino delgado tiene la capacidad de absorber pequeños péptidos y aminoácidos (Bröer, 2008) y la absorción de estos es mediada por los transportadores de péptidos y aminoácidos, respectivamente (Closs *et al.*, 2006). Bajo condiciones de estrés nutricional se incrementa la expresión de algunos transportadores de péptidos o AA en el intestino con la finalidad de realizar un eficiente transporte de AA hacia el enterocito (Zhang *et al.*, 2013; He *et al.*, 2013). En dietas a base de cereales-pasta de soya, Lis es el AA más limitante en cerdos (Lewis, A. J., 2001), el cual es transportado a través del enterocito por medio de los transportadores de AA catiónico  $b^{0,+}$  y  $y^{+L}$  principalmente. Los transportadores de AA  $b^{0,+}$  y  $y^{+L}$ , son responsable del transporte apical y basolateral de los AA catiónico, respectivamente; dicho proceso de transporte se lleva a cabo por medio del intercambio de Lis por AA neutros (Torras-Llort *et al.*, 2001). El transportador de AA  $B^0$  es el principal transportador de AA neutros en la región apical de las células epiteliales en riñón e intestino delgado (Bröer, 2008). Cuando la dieta provee un nivel ideal de AA, los genes de los transportadores de AA que regulan el metabolismo de la proteína en lechones debe ser más activa (Wu *et al.*, 2015)

Se reportó que los AA libres aparecen más rápido en sangre portal en comparación con los AA asociados a proteína cuando la alimentación fue suministrada una vez por día (Yen *et al.*, 2004). También se conoce que la CS de AA durante las primeras 3 horas postprandial reflejan la composición de AA en la dieta consumida por los cerdos (Langer y Fuller, 2000; García-villalobos *et al.*, 2012) además de la forma en la cual los AA son incluidos en la dieta (libres o asociados a proteína) (Morales *et al.*, 2015).

La hipótesis de este trabajo fue que el nivel de PC en la dieta y la adición de AA libres afectan la actividad enzimática pancreática, la expresión de transportadores de AA y la CS de AA de cerdos en la etapa de iniciación.

El uso de dietas bajas en proteína y su efecto en el proceso digestivo-absortivo en los cerdos ha sido poco estudiada. Por cual se condujo dos experimentos con cerdos en la etapa de iniciación para evaluar el efecto del nivel de proteína y la adición de AA libres a la dieta sobre la actividad enzimática del páncreas, expresión de transportadores de AA y la concentración de AA en suero.

#### 3.1.4.- MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y alojamiento.

Los cerdos utilizados en este experimento se manejaron siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana en cuidado animal (Norma Oficial Mexicana, 2001). Se llevaron a cabo dos experimentos de manera independiente con 26 cerdos cruzados (Large White X Duroc). Se utilizaron catorce (peso inicial de  $17.2 \pm 1.4$  kg) y doce cerdos (peso inicial  $12.7 \pm 0.6$  kg) en el experimento 1 y 2, respectivamente. En ambos experimentos, los cerdos se asignaron aleatoriamente a los tratamientos. En el experimento 1 hubo siete repeticiones (5 hembras y 2 machos castrados) y en el experimento 2, seis repeticiones (4 hembras y 2 machos castrados). El peso inicial se balanceo en todos los tratamientos. Los cerdos se alojaron de manera individual en jaulas elevadas con piso de malla metálica (1.2 m ancho, 1.2 m largo y 1.0 m alto) equipadas con comederos automáticos de acero inoxidable, bebederos de tipo chupón, y mantenidos a temperatura ambiente (22 a 24 °C). En ambos experimentos, todos los cerdos se alimentaron en pares y el agua se proporcionó a libre acceso.

Ambos experimentos tuvieron un periodo de adaptación de 7 días a las dietas y al medio ambiente, seguido por otros 7 días de evaluación. El peso promedio de los cerdos al final del experimento 1 y 2 fue de 23.2 y 16.7 kg, respectivamente.

## Dietas

Se formularon dos dietas experimentales (cuadro 1) con base en trigo-pasta de soya, utilizando el contenido analizado de AA y los coeficientes de digestibilidad ileal estandarizada (DIE) publicados para trigo y pasta de soya (Stein *et al.*, 2001). La dieta AP fue formulada para cubrir los requerimientos de Lis en base a su DIE para cerdos en el rango de peso 11 a 25 kg (NRC, 2012) y la dieta BPAA fue formulada para una proporción óptima entre los nueve aminoácidos limitantes.

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales (Base tal como se ofrece)

Ingrediente, %	BPAA <sup>1</sup>	AP <sup>2</sup>
Trigo	85.88	51.06
Pasta de soya, 48 %	9.00	41.00
Carbonato de calcio	1.56	1.53
Fosfato dicálcico	0.58	1.00
Sal iodada	0.35	0.35
Premezcla de Vit. y Min <sup>3</sup>	0.20	0.20
Aceite de canola		4.80

<sup>1</sup> BPAA: Dieta baja en PC (19%) adicionada con 0.76% L-Lis.HCl, 0.35% L-Tre, 0.21% DL-Met, 0.05% L-Trp, 0.16% L-Fen, 0.37% L-Leu, 0.18% L-Iso, 0.12% L-His, y 0.23% L-Val.

<sup>2</sup> AP: Dieta alta en PC, sin la adición de AA libres.

<sup>3</sup> Cada kg de dieta contenía: Vitamina A, 4800 IU; vitamina D3, 800 UI; vitamina E, 4.8 UI; vitamina K3, 1.6 mg; riboflavina, 4 mg; ácido pantoténico, 7.2 mg; niacina, 16 mg; vitamina B12, 12.8 g; Zn (sulfato de zinc), 64 mg; Fe (sulfato ferroso), 64 mg; Cu (sulfato de cobre) 4 mg; Mn (sulfato de manganeso), 4 mg; I (ioduro de potasio), 0.36 mg; Se (selenito de sodio), 0.13 mg.

Los tratamientos fueron como sigue: 1) Dieta baja en proteína (19.2 %) adicionada con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Trp, L-Fen, L-Leu, L-Iso, L-His y L-Val (BPAA); y

2) Dieta alta en proteína (28.1%) sin la adición de AA libres (AP). Los aminoácidos libres fueron considerados 100% digestibles. Las dietas BPAA y AP contenían 9 y 41% de pasta de soya respectivamente. La dieta BPAA contenía aproximadamente 50 % de Lis asociada a proteína y 50% Lis libre, mientras que la dieta AP contenía 100% de Lis asociada a proteína. Todas las dietas fueron adicionadas con una premezcla de vitaminas y minerales para cubrir o exceder los requerimientos para cerdos en crecimiento (NRC, 2012) y contenían 10.2 MJ EN/kg. La composición analizada de AA de ambas dietas se presenta en el cuadro 2.

Estas dietas se evaluaron para probar la hipótesis que la actividad de tripsina y quimotripsina, expresión de transportadores de AA y concentración de AA en suero de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AA libres son diferentes a los encontrados en cerdos alimentados con dietas altas en proteína.

#### Colección de tejidos y muestras de sangre

Se colectaron muestras de mucosa de duodeno, yeyuno, e íleon de todos los cerdos del experimento 1. Los cerdos se sacrificaron por medio de aturdimiento eléctrico y desangrado 2.5 h después de ser alimentados en el día 14 del experimento. La canal se eviscero inmediatamente y se tomaron muestras de la mucosa por medio de escarificación de la parte media de duodeno, yeyuno e íleon (aproximadamente 0.5 g) y almacenadas en un microtubo de 2 mL. Las muestras de mucosa se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -82 °C hasta su análisis. El proceso de colección de muestras no excedió los 8 min con la finalidad de maximizar la calidad del ARN extraído. Además, se tomaron muestras de digesta de duodeno y yeyuno de todos los cerdos para medir la actividad de tripsina y quimotripsina.



Cuadro 2. Composición analizada de PC y AA de las dietas experimentales (base tal como se ofrece)

Aminoácido, %	Dietas	
	BPAA	AP
PC	19.18	28.05
Esenciales		
Arg	0.89	1.73
His	0.53	0.71
Iso	0.82	1.21
Leu	1.56	2.1
Lis	1.24	1.42
Met	0.42	0.42
Fen	0.95	1.37
Tre	0.86	0.97
Val	0.97	1.31
No esenciales		
Ala	0.61	1.09
Asp	1.14	2.56
Glu	4.53	5.84
Gli	0.63	1.08
Pro	1.43	1.74
Ser	0.73	1.12
Tir	0.43	0.81

Las muestras de contenido intestinal se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. Las muestras de sangre de los cerdos del experimento 2 fueron colectadas de acuerdo al siguiente protocolo. Los cerdos recibieron su respectiva dieta en la mañana del día 14 después de catorce horas de ayuno. En seguida, se tomaron

las muestras de sangre (aproximadamente 10 mL) de la arteria carótida por medio de punción arterial, 2.5 h después de la alimentación matutina para analizar la concentración de AA libres durante la etapa absorptiva. Inmediatamente después de la colección, las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 x g a 4°C por 10 minutos para separar el suero de las células sanguíneas y posteriormente fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

#### Medición de la actividad enzimática

Las muestras de digesta de duodeno y yeyuno se descongelaron y centrifugaron a 3,000 x g, 4 °C, durante 15 min (Eppendorf Centrifuge 5810r, Hamburg, Germany). El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. La actividad de tripsina y quimotripsina se evaluó en la digesta de acuerdo al protocolo de Hummel, (1959). Para el caso de tripsina, la densidad óptica se leyó a 247 nm, a un intervalo de 1 min, durante 10 min (Spectronic Helios  $\beta$ , Thermo Electron Co. Cambridge, UK). Una unidad de actividad se definió como la hidrólisis de 1  $\mu$ mol de N $\alpha$ -p-toluenosulfonil-L-arginina metil-ester por minuto a 25 °C y pH 8.1 con la presencia de 0.01 M del ion calcio. Para quimotripsina, la densidad óptica se leyó a 256 nm, a un intervalo de 1 min, durante 10 min. Una unidad de actividad se definió como la hidrólisis de 1  $\mu$ mol of N-benzoil-L-tirosina-etil-ester por minuto a 25 °C y pH 7.8.

#### Aislamiento y purificación de ácido ribonucleico (ARN) total

Las muestras de mucosa intestinal se procesaron para el aislamiento de ARN total utilizando Trizol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) y siguiendo el procedimiento descrito por Méndez *et al.* (2011). El RNA purificado se diluyó en 30  $\mu$ L de agua libre de RNasas y se almacenó a -80 °C. La concentración total de ARN se

determinó espectrofotométricamente (Helios  $\beta$ , Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA) a 260 nm, y la pureza del ARN se evaluó utilizando la proporción A260/A280, el cual fluctuó entre 1.8 y 2.0 (Sambrook and Russell, 2001). La integridad del ARN total se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Todas las muestras de ARN tuvieron buena calidad, con una proporción de ARN ribosomal (ARNr) 28S:18S de alrededor de 2.0:1.0 (Sambrook and Russell, 2001).

#### Transcripción reversa.

Aproximadamente 2  $\mu$ g de ARN total fue tratado con 1 U de DNasa I (1 U/ $\mu$ L; Thermo Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA) y 6  $\mu$ L de Buffer de transcripción reversa 5x en una reacción llevada a un volumen de 30  $\mu$ L con agua libre de nucleasas (Thermo Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA); la reacción se llevó a cabo durante 15 min a temperatura ambiente y 15 min a 70 °C para detener la reacción. La transcripción inversa inicio con muestras de ARN tratadas con DNasa, la adicionado de 1  $\mu$ L de random primers (150 ng/ $\mu$ l, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) y 1  $\mu$ L de solución de deoxirribonucleotidos trifosfatados (dNTPs) (10  $\mu$ M cada uno), la reacción se incubó por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se enfrió en hielo por 1 min; se agregaron 3  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 1  $\mu$ L de inhibidor de ribonucleasas (40U/ $\mu$ L; RiboLock, Thermo Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA) y 2  $\mu$ L de buffer de transcripción inversa 5x, y se incubaron a 42 °C durante 2 min para estabilizar la reacción antes de adicionar 1  $\mu$ L de la enzima de transcripción inversa (200 U/ $\mu$ L; RevertAid H Minus, Thermo Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA). La reacción se incubó a 42 °C durante 50 minutos, posteriormente a 70 °C durante 15 min, y después se enfrió en hielo para

detener la reacción. Las muestras de ADN complementario (ADNc) se cuantificaron espectrofotométricamente y se diluyeron en una concentración final de 50 ng/μL.

#### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para  $b^{0,+}$ ,  $y^{+L}$ ,  $B^0$ , y ARNr 18S de acuerdo las secuencias publicados en el Genbank (Cuadro 3). El ARNr 18S se utilizó como control interno (GenBank AY265350) para normalizar la variación del ARN mensajero (ARNm). Antes de iniciar con PCR cuantitativo (PCRq), se llevó a cabo un PCR punto final para estandarizar las condiciones de amplificación de cada par de oligonucleótidos, y con la finalidad de confirmar la especificidad de los productos de PCR con relación a su ARNm y finalmente se secuenció una muestra de cada producto de PCR en Davis Sequencing Facility (Davis, CA, USA). Los resultados de secuenciación revelaron que los productos para  $b^{0,+}$ ,  $y^{+L}$ ,  $B^0$ , y ARNr 18S tuvieron una homología del 100% con respecto a su respectiva secuencia esperada. La expresión de genes (abundancia relativa de ARNm) que codifican para  $b^{0,+}$ ,  $y^{+L}$  y  $B^0$  se estimaron mediante ensayos de PCRq, utilizando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA) en un termociclador Chromo 4DNA Engine con el programa computacional MJ Opticon Monitor 3.1 (Bio-Rad, Herefordshire, England). El equipo se calibro con una curva estándar utilizando ARNr 18S clonado en el vector TOPO 4.0. La curva estándar se obtuvo utilizando concentraciones conocidas de diluciones en serie de 100 veces del ADNc de ARNr 18S. La reacción de PCRq contenía 50 ng de ADNc, 0.5 μM de cada oligonucleótido específico, 12.5 μL de mezcla maestra SYBR green/ROX qPCR 2x, y se adicionó agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 25 μL.

Cuadro 3. Oligonucleótidos para análisis de PCRq de ADNc derivado del ARNm de transportadores de AA b<sup>0,+</sup>, y<sup>+</sup>L, B<sup>0</sup> y ARNr 18S de cerdo.

ARNm	Iniciador	Loc. en el templado (pb)	Secuencia	Producto (pb)
b <sup>0,+</sup> : <i>Sus scrofa</i> Transportador de AA catiónicos b <sup>0,+</sup> ( <i>SLC7A9</i> , GenBank: EF127857)				
	Sentido	1-19	5'CGGAGAGAGGATGAGAAGT3'	562
	Antisentido	545-562	5'GCCCCGCTGATGATGATGATGA3'	
y <sup>+</sup> L: <i>Sus scrofa</i> Transportador de AA catiónicos y <sup>+</sup> L ( <i>SLC7A7</i> , GenBank: NM001110421.1)				
	Sentido	4239-4258	5'TCAAGTGGGGAACCCTGGTA3'	259
	Antisentido	4548-4567	5'ATGGAGAGGGGCAGATTCCT3'	
B <sup>0</sup> : <i>Sus scrofa</i> Transportador de AA neutros B <sup>0</sup> ( <i>SLC6A19</i> , GenBank: DQ231579.1)				
	Sentido	8-28	5'TCTGTCCACAACAACACTGCGAG3'	205
	Antisentido	193-212	5'CAGCGAAGTTCTCCTGCGTC3'	
ARNr 18S : <i>Sus scrofa</i> ARNm ribosomal 18S (GenBank: AY265350)				
	Sentido	236-255	5'GGCCTCACTAAACCATCCAA3'	295
	Antisentido	511-530	5'TAGAGGGACAAGTGGCGTTC3'	

Las condiciones del PCR utilizadas para la amplificación y cuantificación fueron: una etapa inicial de desnaturalización (95 °C por 1 min), seguido de 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineación a 56 °C durante 15 s, y extensión a 72 °C durante 30 s) y un programa de curva de desnaturalización (60 °C a 90 °C). Se midió la fluorescencia al final de cada ciclo y cada 0.2 °C durante el programa de desnaturalización. La abundancia relativa del ARNm fue normalizada respecto a la abundancia de 18S, calculando la proporción de abundancia relativa de cada ARNm: 18S (Liao *et al.*, 2009).

### Análisis de aminoácidos en las dietas y en suero.

El análisis de AA se llevó a cabo en el laboratorio de Evonik Industries AG, Hanau-Wolfgang, Alemania. La concentración de los aminoácidos en las dietas se determinó por medio de cromatografía de intercambio iónico con detección postcolumna con ninhidrina, excepto Trp. Los aminoácidos se oxidaron con ácido perbórico, que fue neutralizado con metabisulfito de sodio (Llames and Fontaine, 1994; Commission Directive, 1998; 2000). La proteína de la dieta se hidrolizó con 6 N HCL por 24 h a 110 °C. La concentración de AA en suero se determinó por medio de cromatografía de intercambio iónico utilizando un analizador de aminoácidos en columna de litio Biochrom 20 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) y buffers de litio. Los AA se determinaron después de disolver las muestras de suero liofilizadas y de la precipitación de las proteínas con ácido sulfosalicílico y centrifugado a 10 000 rpm durante 30 min a temperatura entre 20-25 °C. Los AA se cuantificaron utilizando un estándar interno, norleucina, midiendo la absorción de los productos de la reacción con ninhidrina a 570 y 440 nm.

### Análisis estadístico.

El análisis de datos de todas las variables se llevó a cabo por medio de la prueba de t-student como muestras independientes utilizando SAS (Statistical Analysis System 9.1; SAS Inst. Inc., Cary, NC). Los niveles de probabilidad de  $P \leq 0.05$  y  $0.05 < P \leq 0.10$  se definieron como diferencias significativas y tendencias, respectivamente.

### 3.1.5.- RESULTADOS

#### Actividad enzimática

La actividad enzimática de tripsina y quimotripsina se presentan en la figura 1.

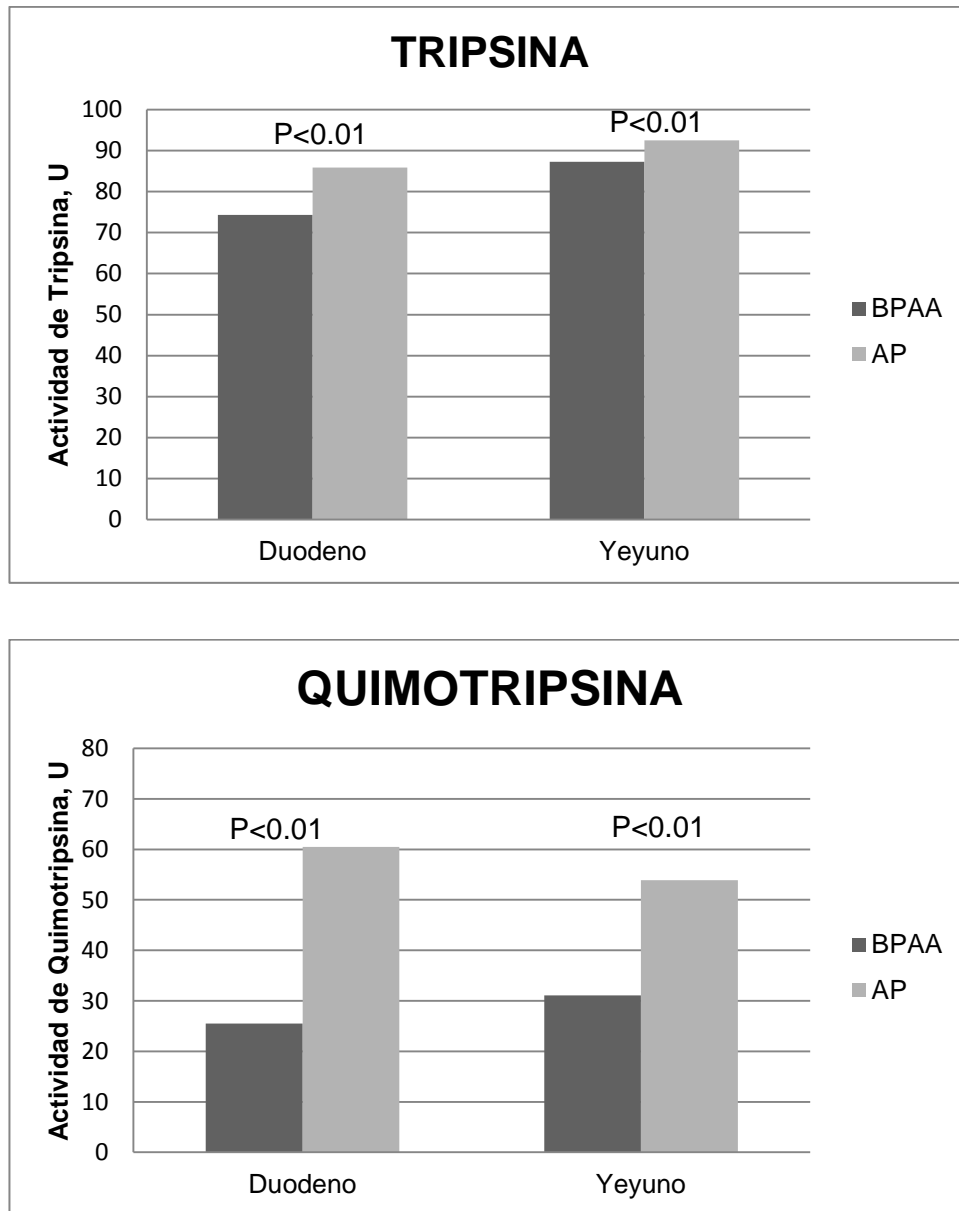


Figura 1. Actividad de tripsina y quimotripsina en duodeno y yeyuno de cerdos alimentados con la dieta BPAA o AP.

Los cerdos alimentados con la dieta AP tuvieron una mayor actividad de tripsina y quimotripsina en la digesta de ambos segmentos intestinales, duodeno y yeyuno ( $P < 0.001$ ). Independientemente del tipo de dieta, en promedio la actividad de tripsina fue mayor en yeyuno que en duodeno ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, la actividad promedio de quimotripsina no fue diferente entre la digesta de duodeno y yeyuno ( $P > 0.10$ ).

#### Expresión de genes

Los valores de expresión de genes que codifican para dos transportadores de AA catiónicos ( $b^{0,+}$  y  $y^+L$ ) y uno neutro ( $B^0$ ) en el intestino delgado de cerdos se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Expresión de transportadores de AA en intestino delgado de cerdos en iniciación alimentados con la dieta BPAA o AP (Unidades arbitrarias, proporción de moléculas del ARNm: ARNr 18S).

Transportador	Segmento intestinal	Dieta <sup>a</sup>			Valor de <i>P</i>
		BPAA	AP	EEM	
$b^{0,+}$ (SLC7A9) <sup>b</sup>	Duodeno	0.0649	0.0385	0.0071	0.03
	Yeyuno	0.0281	0.0295	0.0054	0.857
	Íleon	0.0139	0.0105	0.0019	0.236
$y^+L$ (SLC7A7)	Duodeno	0.0154	0.011	0.0019	0.098
	Yeyuno	0.0262	0.0334	0.0053	0.37
	Íleon	nd	nd	nd	nd <sup>c</sup>
$B^0$ (SLC6A19)	Duodeno	0.0337	0.0333	0.0041	0.947
	Yeyuno	0.0374	0.0387	0.0081	0.913
	Íleon	0.0374	0.0091	0.0061	0.011

<sup>a</sup> Dietas: BPAA, Dieta a base de trigo-pasta de soya baja en PC (14%) adicionada con AA; AP, dieta base trigo-pasta de soya alta en PC sin la adición de AA.

<sup>b</sup> Cerdos alimentados con la dieta BPAA: Duodeno vs. Yeyuno,  $P < 0.01$

<sup>c</sup> Expresión de  $y^+L$  no fue detectada en íleon.



La expresión de  $b^{0,+}$  en duodeno fue más alta ( $P=0.030$ ) en cerdos alimentados con la dieta BPAA comparado con los de la dieta AP; sin embargo no se observó diferencia en yeyuno e íleon entre cerdos alimentados con la dieta BPAA y AP ( $P>0.10$ ). La expresión de  $y^+L$  en duodeno tuvo una tendencia a ser más alta en cerdos alimentados con la dieta BPAA ( $P=0.098$ ), sin embargo no hubo diferencias entre tratamientos para la expresión de  $y^+L$  en yeyuno ( $P>0.10$ ); no se detectó expresión de  $y^+L$  en íleon. La expresión de  $B^0$  en duodeno y yeyuno no fue afectada por el tipo de dieta ( $P>0.10$ ), no obstante en íleon, la expresión fue más alta en cerdos alimentados con la dieta BPAA ( $P=0.011$ ).

La expresión comparativa de los transportadores de los AA  $b^{0,+}$  y  $B^0$  en duodeno, yeyuno e íleon se presentan en la figura 2. En cerdos alimentados con la dieta BPAA (Panel A), la expresión de  $b^{0,+}$  en duodeno fue más alta que en yeyuno e íleon ( $P<0.01$ ), pero no se observaron diferencias entre yeyuno e íleon ( $P>0.10$ ). La expresión de  $B^0$  no fue diferente entre los tres segmentos intestinales ( $P>0.10$ ). Para los cerdos alimentados con la dieta AP (Panel B), la expresión de los transportadores de AA  $b^{0,+}$  y  $B^0$  no fueron diferentes al comparar duodeno con yeyuno ( $P>0.10$ ); sin embargo la expresión de estos transportadores de AA fueron más altos en duodeno y yeyuno comparado con íleon ( $P<0.01$ ).

#### Concentración de aminoácidos en suero

La concentración en suero postprandial (CS) de aminoácidos se presentan en el cuadro 5. La concentración de Arg en suero fue más alta ( $P=0.011$ ) en cerdos alimentados con la dieta AP. Por el contrario, la concentración en suero de Lis ( $P<0.049$ ), Met ( $P=0.027$ ) y Tre ( $P=0.037$ ) fueron más altos en cerdos alimentados con

la dieta BPAA. La concentración en suero de His, Iso, Leu, Fen y Val, no fueron afectados por el tipo de dieta. La concentración en suero de Asn fue más alta (P=0.006) en cerdos alimentados con la dieta AP.

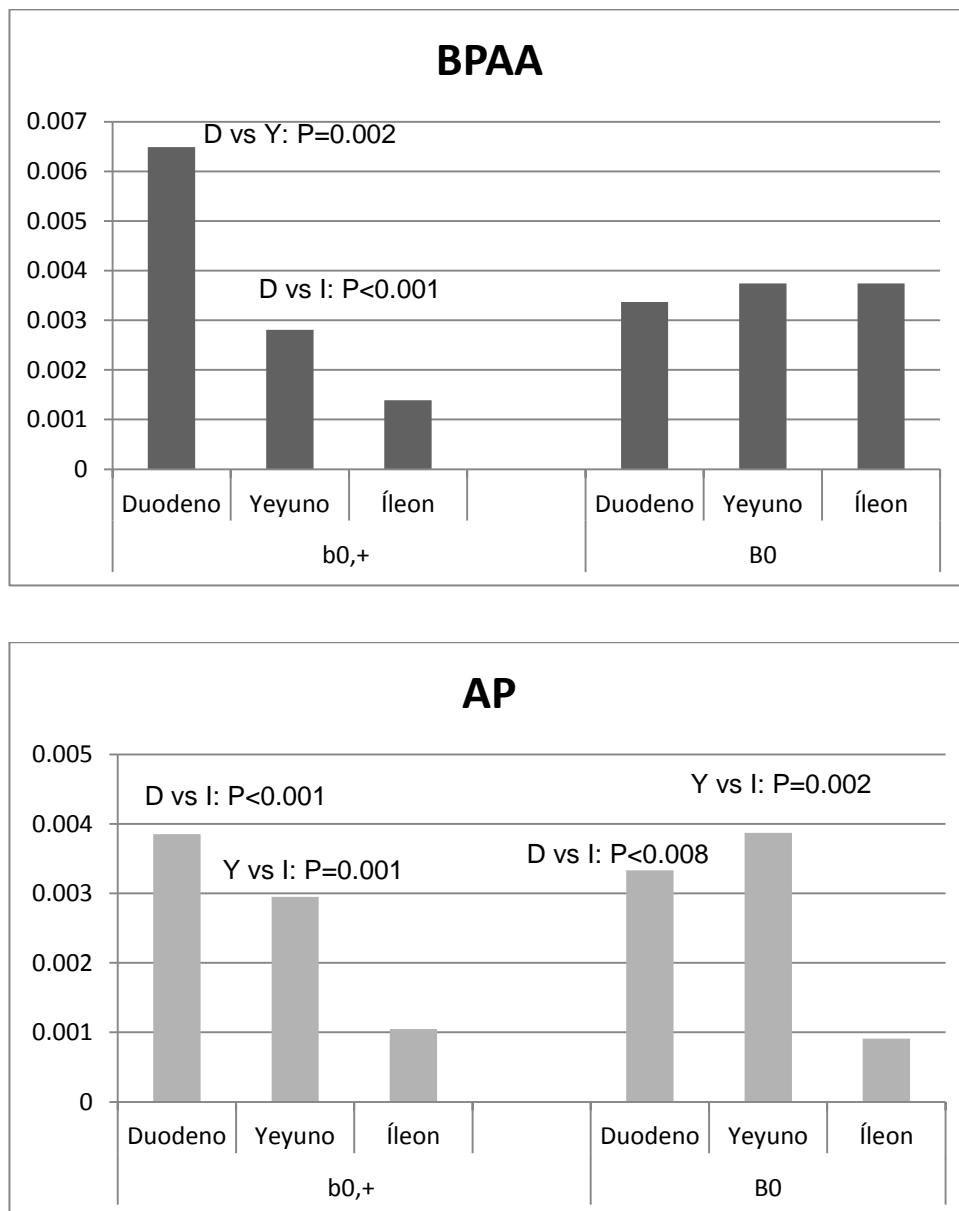


Figura 2. Expresión de transportadores de AA  $b^{0,+}$  y  $B^0$  en duodeno (D), yeyuno (Y) e íleon (I) de cerdos en iniciación alimentados con la dieta BPAA o AP (Unidades arbitrarias, proporción de moléculas del ARNm: ARNr 18S).

En cambio, la concentración en suero de Asp tendió a ser más baja ( $P=0.094$ ), y Glu fue más bajo en cerdos alimentados con la dieta AP. No se encontraron diferencias en la concentración en suero de Ala, Asp, Gli y Pro entre tratamientos ( $P>0.10$ ).

Cuadro 5. Concentración post-prandial de AA libres (mg/100 mL) en cerdos en iniciación alimentados con la dieta BPAA o AP.

Aminoácido	BPAA	AP	EEM	Valor de <i>P</i>
AA esenciales				
Arg	2.528	4.300	0.454	0.011
His	1.244	1.688	0.205	0.141
Iso	1.992	2.318	0.326	0.487
Leu	3.344	2.878	0.537	0.546
Lis	4.147	1.954	0.747	0.049
Met	1.173	0.631	0.162	0.027
Fen	1.614	1.998	0.233	0.257
Tre	4.336	2.295	0.649	0.037
Val	3.318	2.775	0.510	0.533
AA no esenciales				
Ala	7.920	6.445	0.910	0.264
Asn	0.944	1.688	0.173	0.006
Asp	0.269	0.195	0.030	0.094
Gln	8.547	7.448	0.987	0.439
Glu	3.198	1.465	0.366	0.003
Gli	5.818	5.816	0.664	0.999
Pro	4.401	4.786	0.530	0.616
Ser	1.508	1.892	0.236	0.263

### 3.1.6.- DISCUSIÓN

Debido a que la digestión de las proteínas ocurre principalmente en duodeno y yeyuno (Asche *et al.*, 1989; Yen, 2001;), se evaluó la actividad de las enzimas proteolíticas tripsina y quimotripsina en estos dos segmentos del Intestino delgado (Goodman, 2011; Ganapathy, 2012). La producción de zimógenos que precede al proceso digestivo por las proteínas, está influenciado por los cambios en la composición de la dieta (Morriset y Dunigan, 1971; Partridge *et al.*, 1982; He *et al.*, 2013). En el presente experimento, el incremento en el contenido de PC en la dieta, aumento la actividad de tripsina y quimotripsina en duodeno y yeyuno reafirma los resultados reportados por Imondi y Bird, (1967) en pollos de engorda. Este aumento en actividad de tripsina fue del 16 y 6 % en duodeno y yeyuno respectivamente; para el caso de quimotripsina este incremento fue del 137 y 73 %, respectivamente. Los resultados anteriores concuerdan con lo publicado por Schneeman *et al.*, (1977) quienes utilizaron dietas a base de caseína hidrolizada y sin hidrolizar demostrando que la forma en la cual se provee la proteína afecta la actividad enzimática pancreática. El nivel de PC en la dieta modifico la actividad enzimática en duodeno y yeyuno como una respuesta fisiológica de retroalimentación positiva al enriquecimiento del nivel de proteína en la dieta (Green *et al.*, 1973).

En la dieta BPAA aproximadamente el 70% del nitrógeno estaba en forma de proteína comparada con el 100% de la dieta AP, esta diferencia en cantidad de nitrógeno asociado a proteína pudo ocasionar el incrementado en la actividad secretora del páncreas debido a que estudios previos (Morriset y Dunnigan, 1971; He *et al.*, 2013) demostraron que el nivel de proteína en la dieta estimula la actividad secretora del

páncreas. Además Baumler *et al.* (2010) demostraron que la producción de tripsinogeno se disminuyó de manera importante cuando el nitrógeno en la dieta provino de AA libres. En este sentido los aminoácidos en la dieta fueron incapaces de mantener la masa pancreática (Imondi y Bird, 1967), y producción de gránulos de zimógenos en ratas. Al evaluar el cambio en el nivel de actividad de tripsina entre duodeno y yeyuno, independientemente del tipo de tratamiento, la actividad de ésta se incrementó en un 12 % en yeyuno respecto a duodeno. En general el incremento de la actividad de las enzimas proteolíticas pudiera deberse a que las proteínas son sustrato de tripsina y quimotripsina, y no así los AA libres (Green *et al.*, 1973).

Por lo general el nivel de nutrientes en la dieta tiene influencia en la forma de como se lleva a cabo la absorción de los mismos en el intestino delgado (Gilbert *et al.*, 2008). El intestino delgado tiene la capacidad de absorber pequeños péptidos y aminoácidos (Bröer, 2008) y que la absorción de estos es mediada por los transportadores de péptidos y aminoácidos respectivamente (Closs *et al.*, 2006). Bajo condiciones de estrés nutricional o cuando ocurre una reducción del nivel de consumo de proteína, esto pudiera incrementar la expresión de algunos transportadores AA en el intestino con la finalidad de realizar un eficiente transporte de AA hacia el enterocito (Zhang *et al.*, 2013; He *et al.*, 2013). Los transportadores de AA catiónico  $b^{0,+}$  y  $y^+L$  son los responsables del transporte apical y basolateral de los AA catiónicos (Palacin *et al.*, 2001), respectivamente y este proceso se lleva a cabo por medio del intercambio por AA neutros (Torras-Llort *et al.*, 2001). En duodeno, la expresión del transportador de AA catiónicos  $b^{0,+}$  en cerdos alimentados con la dieta BPAA tuvo un incremento en la expresión respecto a los cerdos alimentado con la dieta AP. Resultados similares

fueron reportados (Torras-Llort *et al.*, 1998; García-Villalobos *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013) utilizando dietas con diferente nivel de proteína y adicionadas con AA libres. Lo anterior pudiera indicar un aumento de expresión de este transportador de AA como resultado del estímulo por la presencia de AA libres en la luz intestinal. Sin embargo, los resultados de expresión de  $b^{0,+}$  no ha sido consistentes, algunos reportaron no diferencias o una disminución de la expresión cuando los cerdos fueron alimentados con AA libres (Liao *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Respecto a la expresión de  $y^+L$ , este tuvo una tendencia a incrementar con la disminución del nivel de PC en la dieta coincidiendo parcialmente con los resultados de He *et al.* (2013), pero contradiciendo los resultados de otros investigadores (Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015). Los cambios de expresión en duodeno para  $b^{0,+}$  y  $y^+L$  representaron 41 y 29% respectivamente al comparar cerdos alimentados con la dieta BPAA y AP. Lo anterior coincide con los resultados de He *et al.* (2013) obtenidos en condiciones similares. Para el caso de la dieta BPAA, al continuar la digesta en su avance por el intestino delgado, la disponibilidad de AA catiónicos disminuye y de igual manera la necesidad de sus transportadores, esto pudiera explicar la falta de diferencia en la expresión de transportadores de AA catiónicos en yeyuno e íleon. El transportador de AA  $B^0$  es el principal transportador de AA neutros en la región apical en de la células epiteliales de riñón e intestino delgado (Bröer, 2008). La disminución del nivel de proteína y la adición de AA libres en la dieta incrementó la expresión de  $B^0$  en íleon, resultados similares fueron reportados por Sun *et al.* (2015) en donde la expresión de este transportador se incrementó al adicionar AA en la dieta. Sin embargo otros investigadores reportaron que el nivel de proteína o AA no afecto (Zangh *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2015) e incluso disminuyo (Wu *et al.*, 2015; Yang *et*

*al.*, 2012) la expresión de el trasportador de AA B<sup>0</sup>. Se especula que la abundante expresión del transportador de AA catiónicos b<sup>0,+</sup> y la concomitante demanda de AA neutros como elementos de intercambio (Torras-Llort *et al.*, 2001), pudieran ser los responsable del incremento de la expresión de B<sup>0</sup> en íleon de cerdos alimentados con la dieta BPAA. La CS de AA libres en cerdos provienen de la proteína de los tejido degradados y de aquellas ingeridas con la dieta y son absorbidos en el intestino delgado (Yen *et al.*, 2004). En este experimento, dos condiciones pudieran favorecer la absorción de los AA, por un lado se especula que la expresión de los genes que codifican para los transportadores de AA se ven reflejadas completamente en la proteína transportadora (Dave *at al.*, 2004). Y por el otro los AA en forma libre se absorben más rápido que los AA asociados a proteínas (Rojas-García y Rønnestad, 2003). El contenido de AA libres a la dieta BPAA representaron el 61, 50, 41, 24, 22, 24, 23 y 17 % para Lis, Tre, Met, Leu, Iso, Val, His, y Fen, respectivamente. Los cerdos alimentados con la dieta BPAA tuvieron una mayor CS postprandial de Lis, Met y Tre, lo cual representaron un incremento del 53, 47 y 46%, respectivamente. Lo anterior refleja la mayor velocidad de absorción de los AA libres en intestino delgado, coincidiendo con lo previamente publicado por otros autores (Rojas-García y Rønnestad, 2003; Yen *et al.*, 2004). De manera similar Morales *et al.* (2015) demostraron que la CS postprandial de AA de cerdos en crecimiento, reflejan la forma en la cual éstos son incluidos en la dieta (libres o asociados a proteína). De acuerdo con Wu *et al.*, (2004) Arg es necesaria para la síntesis de proteína, urea, poliaminas, y óxido nítrico en lechones. Para el caso de Arg, esta se adicionó en aproximadamente 94% en exceso en la dieta AP y que de igual manera se vio reflejada en la CS, representado un 70% más de Arg en suero. De acuerdo con el concepto de proteína ideal (NRC, 2012), la relación Arg:Lis en la dieta

BPAA (60:100) estuvo muy cercana al óptimo, comparada con un exceso de aproximadamente 200 % observado en la dieta AP(220:100). Lo anterior pudiera indicar que con respecto a Arg, la reducción del nivel de PC en dietas base trigo-PS no generó deficiencias de este AA, considerado AA limitante en cerdos jóvenes (Wu *et al.*, 2004). Para el caso de His, Iso, Leu y Fen, no hubo diferencias significativas entre tratamientos. En el caso de los AA neutros, la CS de estos no fue afectada por la reducción del nivel de PC en la dieta, y al mismo tiempo no pudieran comprometer el suministro de los mismo durante el transporte de los AA catiónicos (Torras-Llort *et al.*, 2001) más importantes en cerdos jóvenes (Lis y Arg) (NRC, 2012; Wu *et al.*, 2004). Nuestros resultados parecen indicar que el incremento de Lis, Tre y Met en suero de los cerdos alimentados con la dieta BPAA se debe a la forma en la que fue adicionada (libre y lista para su absorción). La mayor CS de Lis pudiera deberse a la combinación entre el incremento en la cantidad de Lis libre en el lumen intestinal y a una mayor expresión del transportador de AA catiónicos b<sup>0,+</sup> en intestino delgado.

### 3.1.7.- CONCLUSIÓN

Los resultados indican que el nivel de proteína y la adición de AA libres modifican la actividad enzimática pancreática, la expresión de los transportadores de AA en intestino delgado y el nivel de AA en suero de cerdos jóvenes.



3.2.- Dietas bajas en proteína adicionadas con aminoácidos libres: efecto en el comportamiento productivo, composición de la canal y concentración de aminoácidos en suero de cerdos en crecimiento

### 3.2.1.- RESUMEN

Se utilizaron 48 cerdos en la etapa de crecimiento (24.3 kg PV inicial) bajo un diseño completamente al azar. Se evaluó el efecto del nivel de proteína cruda (PC) y la forma en que se adicionan los aminoácidos (AA) en la dieta sobre el comportamiento productivo, características de la canal y concentración en suero (CS) de AA. Los tratamientos fueron: 1) Dieta baja en proteína (14%) adicionada con L-Lis HCl, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen (BPAA); 2) como en BPAA más L-Gli (BPAA+N); 3) Dieta con contenido de PC intermedio (16%) suplementada con L-Lis HCl, L-Tre, y DL-Met (MPAA); y 4) Dieta alta en PC (22%) (AP) sin la adición de AA libres. Al finalizar el experimento, se sacrificaron ocho cerdos de los tratamientos BPAA y AP y se colectó muestras sanguíneas, además se diseccionó la canal. No hubo diferencias entre tratamientos en GDP, CDA, relación G: C, y componentes de la canal. El peso de intestino grueso y riñón fueron mayores en cerdos alimentados con la dieta AP ( $P < 0.001$ ). La CS de Lis y Met fueron más bajas sin embargo Arg, His, Iso, Leu, Fen, y Val fueron más altos en el tratamiento AP ( $P < 0.05$ ). Estos resultados indican que en dietas altas en proteína base trigo-pasta de soya, la PC puede ser reducida hasta por ocho unidades porcentuales sin afectar el comportamiento productivo. El nitrógeno no esencial no parece ser limitante bajo estas condiciones. Además, la inclusión de aminoácidos libres en la dieta parece afectar la concentración en suero de aminoácidos.

**Palabras clave:** Proteína cruda, comportamiento productivo, y características de la canal

### 3.2.2.- ABSTRACT

Forty-eight growing pigs (24.3 kg, initial BW) in a complete randomized design were used; pigs were randomly assigned to four treatments to evaluate the effect of the crude protein (PC) level and form in which AA are added to diets on performance, carcass composition and serum concentration(CS) of AA in pigs. The dietary treatments were as follow: 1) low-PC (14%) diet supplemented with L-Lys, L-Thr, DL-Met, L-Leu, L-Ile, L-Val, L-His, L-Trp, and L-phe (BPAA); 2) as in the BPAA but with added L-Gly as non-essential nitrogen source (BPAA+N); 3) intermediate PC content (16%) supplemented with L-Lys HCl, L-Thr, and DL-Met (MPAA); and 4) high-PC (22%) diet (AP) without free AA. At the end of the experiment, 8 pigs from BPAA and AP were sacrificed to collect blood samples and to dissect the carcasses. There were no differences in GDP, CDA, proportion gain:feed, and weights of carcass components between treatments. Weights of the large intestine and kidney were higher in AP pigs ( $P < 0.01$ ). The serum concentration of Lys and Met were lower in pigs fed the AP diet; however the serum concentration of Arg, His, Ile, Leu, Phe, and Val was higher for this dietary treatment ( $P < 0.05$ ). These results indicate that high crude protein diets can be substitute up to eight percentage units of protein in wheat–soybean meal based diets without affecting pig performance; non-essential nitrogen does not seem to be limiting in very low-protein wheat–soybean meal diets for growing pigs. Also, the inclusion of free AA in the diet appears to affect their serum concentration of pigs.

**Key words:** Crude protein, growth performance, and carcass composition

### 3.2.3.- INTRODUCCIÓN

La alimentación con dietas bajas en proteína cruda (PC) adicionadas con aminoácidos (AA) libres en cerdos se ha vuelto una práctica común debido al mejoramiento en el perfil de AA y la reducción de la excreción de compuestos nitrogenados al ambiente (Carters *et al.*, 1996). Estas dietas contienen AA libres listos para su absorción en duodeno y AA asociados a proteína que necesitan pasar por un proceso digestivo para ser liberados antes de su absorción.

Se reporta que la alimentación de cerdos con dietas bajas en PC tiene como consecuencia una reducción en el comportamiento productivo y un alto contenido de grasa en la canal cuando el nivel de PC se reduce cuatro o más unidades porcentuales en la dieta (Figuroa *et al.*, 2003). La reducción del nivel de PC y la adición de los aminoácidos más limitantes en forma libre pudieran conducir a que 1 o más aminoácidos se vuelvan limitantes (Tuitoek *et al.*, 1997; Yue y Quiao, 2008). Otros factores que pudieran influir sobre la discrepancia de los resultados en el comportamiento productivo de los cerdos es el sistema de energía (EM vs EN) utilizado para la formulación de las dietas (Noblet *et al.*, 1994). El nivel de energía con el cual se formulan las dietas (Kerr *et al.*, 2003) y el contenido de nitrógeno no esencial en las dietas (Kendall *et al.*, 2004). Actualmente existen cinco aminoácidos esenciales en forma libres, lo cual facilita el mejoramiento del perfil de AA al momento de la formulación de las dietas, pero que también cambia el orden de limitancia y el contenido de nitrógeno no esencial.

La hipótesis es que las dietas bajas en proteína adicionadas con AA libres formuladas con contenido similar de EN y bajo el concepto de proteína ideal no afecta

el comportamiento productivo, composición de la canal y la concentración de AA en suero de cerdos en la etapa de crecimiento.

El objetivo es evaluar el desempeño productivo, características de la canal y la concentración en suero de AA en cerdos en crecimiento alimentados con dietas bajas en proteína y adicionadas con AA libres.

### 3.2.4.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### Animales y alojamiento

Los cerdos utilizados en este experimento se manejaron siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana en cuidado animal (Norma Oficial Mexicana, 2001). Cuarenta y ocho cerdos cruzados (Large White X Duroc) con un peso inicial de  $24.3 \pm 1.0$  kg distribuidos al azar en cuatro tratamientos con base en peso inicial, sexo, y camada, con 12 repeticiones por tratamiento (7 hembras y 5 machos castrados) por un periodo experimental de 21 días. El peso vivo inicial fue balanceado en todos los tratamientos. Los cerdos se alojaron de manera individual en jaulas elevadas con piso de malla metálica (1.2 m ancho, 1.2 m largo y 1.0 m alto) equipadas con comederos automáticos de acero inoxidable, bebederos de tipo chupón, y mantenidos a temperatura ambiente (22-24 °C). El alimento y agua se ofrecieron a libre acceso. Los cerdos y el alimento desaparecido se pesaron cada 7 días. La ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA), y relación ganancia:consumo (G:C) se calcularon semanalmente. El peso vivo al final del experimento fue de  $39.8 \pm 1.3$  kg.

## Dietas

Se formularon cuatro dietas (Cuadro 6) a base de trigo-pasta de soya (T-PS) para cubrir los requerimientos de cerdos de 25 a 50 kg (NRC, 2012), utilizando el contenido analizado de aminoácidos (Cuadro 7) y los coeficientes publicados de digestibilidad ileal estandarizada (DIE) de trigo y pasta de soya (Stein *et al.*, 2001). Los tratamientos fueron de la siguiente manera: 1) Dieta baja en proteína (14%) suplementada con L-Lis HCl, L-Tre, DL-Met, L-Trp, L-Fen, L-Leu, L-Iso, L-His y L-Val (BPAA); 2) como en BPAA pero con la adición de L-Gli como fuente de N no esencial (BPAA+N); 3) Dieta con contenido de PC intermedio (16%) suplementada con L-Lis HCl, L-Tre, y DL-Met (MPAA); y 4) Dieta alta en proteína (22%) (AP) sin la adición de AA libres. La dieta AP fue formulada para cubrir los requerimientos de Lis en base a DIE para cerdos. Las dietas MPAA y BPAA fueron formuladas para una proporción óptima entre los 3 y 9 aminoácidos limitantes respectivamente; los aminoácidos libres fueron considerados 100% DIE. El contenido de PS en las dietas BPAA, MPAA y AP fue 4, 13 y 30% respectivamente. La dieta BPAA contenía aproximadamente 35% de Lis asociada a proteína y 65% de Lis libre mientras que la dieta AP contenía 100% de Lis asociada a proteína. Las dietas BPAA y AP fueron incluidas para probar la hipótesis que los cerdos alimentados con dietas bajas en proteína, suplementadas con AA, tienen un comportamiento similar a los cerdos alimentados con dietas AP. La dieta MPAA fue incluida debido a que L-Lis HCl, L-Tre y DL-Met son los aminoácidos fácilmente disponibles a nivel comercial. La dieta BPAA+N fue incluida para probar la hipótesis que el nitrógeno no esencial o glicina en dietas BPAA limita el comportamiento productivo; de acuerdo con Rees *et al.* (1992), glicina es una buena fuente de nitrógeno no esencial

Cuadro 6. Composición de las dietas experimentales (base tal como se ofrece)

Ingredientes, %	Dietas <sup>1</sup>			
	BPAA	BPAA+N	MP	AP
Trigo	91.46	90.45	81.73	65
Pasta de soya	4	4	13.8	30.27
L-Lis-HCl	0.8	0.8	0.5	
L-Tre	0.27	0.27	0.15	
DL-Met	0.11	0.11	0.07	
L-Trp	0.04	0.04		
L-Fen	0.09	0.09		
L-Leu	0.24	0.25		
L-Iso	0.13	0.14		
L-His	0.08	0.08		
L-Val	0.17	0.17	0.02	
Carbonato de calcio	1.4	1.4	1.28	1.25
Ortofosfato	0.65	0.7	0.7	1
Sal iodada	0.35	0.35	0.35	0.35
Premezcla de Vit. y Min <sup>2</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2
Glicina		1		
Aceite de Canola			1.2	2
<i>Contenido calculado</i>				
EN, MJ/kg	10.26	10.25	10.23	10.10
PC, %	14.0	14.0	16.0	22.0
DIE Arg, %	0.59	0.58	0.85	1.30
DIE His, %	0.34	0.34	0.35	0.50
DIE Iso, %	0.52	0.53	0.54	0.80
DIE Leu, %	0.99	0.99	0.99	1.39
DIE Lis, %	0.98	0.98	0.98	0.98
DIE Met, %	0.28	0.28	0.28	0.28
DIE Fen, %	0.55	0.54	0.58	0.63
DIE Tre, %	0.59	0.59	0.61	0.68
DIE Trp, %	0.18	0.17	0.18	0.25
DIE Val, %	0.64	0.64	0.64	0.88

<sup>1</sup>BPAA = Dieta baja en PC (14%) adicionada con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-Trp y L-Fen; BPAA+N = Como en BPAA y adicionada con Gli como fuente de nitrógeno no esencial; MPAA = Nivel de PC intermedio (16%) adicionada con L-Lis, L-Tre, DL-Met; AP = Alta en proteína (22%)

<sup>2</sup>Cada kg de dieta contenía: Vitamina A, 4800 IU; vitamina D3, 800 UI; vitamina E, 4.8 UI; vitamina K3, 1.6 mg; riboflavina, 4 mg; ácido pantoténico, 7.2 mg; niacina, 16 mg; vitamina B12, 12.8 g; Zn (sulfato de zinc), 64 mg; Fe (sulfato ferroso), 64 mg; Cu (sulfato de cobre) 4 mg; Mn (sulfato de manganeso), 4 mg; I (ioduro de potasio), 0.36 mg; Se (selenito de sodio), 0.13 mg.

Cuadro 7. Composición analizada de dietas experimentales

Aminoácido,%	Dietas <sup>1</sup>			
	BPAA	BPAA+N	MP+AA	AP
Nitrógeno total	2.76	2.89	3.09	3.86
AA esenciales				
Arg	0.77	0.78	1	1.5
His	0.43	0.44	0.44	0.6
Iso	0.66	0.68	0.71	1
Leu	1.29	1.31	1.29	1.77
Lis	1.07	1.06	1.06	1.13
Met	0.33	0.35	0.34	0.35
Fen	0.81	0.81	0.86	1.18
Tre	0.66	0.71	0.74	0.83
Trp	0.22	0.23	0.23	0.32
Val	0.82	0.82	0.84	1.11
AA no esenciales				
Ala	0.54	0.54	0.66	0.94
Asp	0.91	0.92	1.32	2.13
Cys	0.33	0.32	0.36	0.43
Glu	4.22	4.2	4.51	5.35
Gli	0.56	1.61	0.69	0.95
Pro	1.42	1.39	1.43	1.63
Ser	0.72	0.71	0.83	1.15

<sup>1</sup>BPAA = Dieta baja en PC (14%) adicionada con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-Trp y L-Fen; BPAA+N = Como en BPAA y adicionada con Gli como fuente de nitrógeno no esencial; MPAA = Nivel de PC intermedio (16%) adicionada con L-Lis, L-Tre, DL-Met; AP = Alta en proteína (22%)

para la síntesis de AA no esenciales. Todas las dietas fueron suplementadas con una premezcla de vitaminas y minerales para cubrir o exceder los requerimientos para cerdos en crecimiento (NRC, 2012) y contenían 10.2 MJ EN/kg.

### Disección de la canal y colección de tejidos

Al finalizar el experimento, se seleccionó ocho cerdos de los tratamientos BPAA y AP de manera aleatoria para la disección de la canal. Al día 21 del experimento, los cerdos se alimentaron con su respectiva dieta después de 11 horas de ayuno; 2.5 horas después de la alimentación, los cerdos se sacrificaron por medio de electrocución y desangrado. Se registró el peso de estómago, intestino delgado y grueso, hígado, corazón, riñón y bazo. La mitad derecha de cada canal se diseccionó completamente después de ser almacenada (2 a 4 °C) por 24 h. Se registró el peso del lomo, jamón, resto de músculos, musculo total y tejido graso total. Como parte de la técnica del sacrificio comparativo, al inicio del experimento se eligió de manera aleatoria y sacrificio 3 cerdos. Las canales se procesaron siguiendo el mismo protocolo al inicio y al finalizar el experimento. También se analizó el contenido de proteína total en las muestras de musculo (Método 984.13; AOAC, 2006). Finalmente, se estimó la ganancia diaria de peso muscular y la acumulación diaria de proteína de manera comparativa con base en la composición inicial y final de la canal.

### Toma de muestras de sangre

Previa a la eutanasia, se tomó muestras de sangre (aproximadamente 10 ml) por medio de punción de la arteria carótida con la finalidad de analizar la concentración de AA libres en suero en la etapa absorptiva. Inmediatamente después de la colección, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500 x g a 4 °C por 10 minutos para separar el suero de las células sanguíneas; el suero se almaceno a -20 °C hasta su análisis.



## Análisis de AA en las dietas y en suero sanguíneo

El análisis de AA se llevó a cabo en el laboratorio de Evonik Industries AG, Hanau-Wolfgang, Alemania. Se determinó la concentración de todos los AA en las dietas, excepto para Tir. Los AA se determinaron por medio de cromatografía de intercambio iónico con detección en postcolumna con ninhidrina. Los AA se oxidaron con ácido per fórmico, el cual fue neutralizado con metabisulfito de sodio (Llames y Fontaine, 1994; Commission Directive, 1998; 2000). Los AA se liberaron de la proteína por hidrólisis con ácido clorhídrico 6 N por 24 h a 110 °C y cuantificado con estándares internos midiendo la absorbancia del producto de reacción con ninhidrina a 570 nm. El Trp se determinó por medio de HPLC con detección de fluorescencia (extinción 280 nm y emisión 356 nm), después de la hidrólisis alcalina con hidróxido de Bario octahidratado por 20 h a 110 °C (Commission Directive, 1998; 2000). No se determinó Tir en este experimento.

La concentración de AA en suero se determinó por medio de cromatografía de intercambio iónico utilizando un analizador de AA en columna de litio, Biochrom 20 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) y buffers de litio. Los AA se determinaron después de la hidratación de las muestras de suero liofilizadas y de la precipitación de las proteínas con ácido sulfosalicílico y centrifugado (30 min a 10 000 rpm; temperatura 20-25 °C). Los AA se determinaron utilizando un estándar interno, norleucina, midiendo la absorción de los productos de la reacción con ninhidrina a 570 y 440 nm.

## Análisis estadístico

El análisis de las variables de comportamiento productivo (GDP, CDA, y ganancia:consumo) y composición de la canal se llevaron a cabo utilizando GLM de

SAS (Statistical Analysis System 9.1; SAS Inst. Inc., Cary, NC). Se construyeron contrastes para probar el efecto de la forma de inclusión de AA, nivel de proteína, y suplementación de nitrógeno no esencial en el comportamiento productivo: contraste 1(C1), BPAA vs BPAA+N; contraste 2(C2), BPAA vs MPAA; y contraste 3(C3), BPAA vs AP. También se construyeron los siguientes contrastes para comparar las medias de los tratamientos para composición de la canal, y fueron los siguientes: C1, BPAA vs MPAA, y C2, BPAA vs AP. Se definió los niveles de probabilidad de  $P \leq 0.05$  y  $0.05 < P \leq 0.10$  como diferencias significativas y tendencias, respectivamente.

### 3.2.5.- RESULTADOS

#### Comportamiento productivo

Los resultados de comportamiento productivo se presentan en el cuadro 8. El peso inicial para los cerdos alimentados con las dietas BPAA, BPAA+N, MPAA y AP fue de 24.3, 24.4, 24.1, y 24.3 kg respectivamente; y el peso vivo final fue de 39.9, 39.8, 39.8 y 39.2 kg respectivamente.

Cuadro 8. Efecto del nivel de PC y la forma (libre o asociada a proteína) de inclusión de AA en las dietas trigo-pasta de soya sobre la GDP, CDA y relación ganancia:consumo.

Variable	Dietas <sup>1</sup>				EEM	Valores de $P^2$		
	BPAA	BPAA+N	MPAA	AP		C1	C2	C3
GDP, kg	0.762	0.742	0.767	0.729	0.03	0.629	0.904	0.429
CDA, kg	1.489	1.471	1.567	1.427	0.59	0.824	0.352	0.457
G:C <sup>3</sup>	0.515	0.509	0.49	0.517	0.02	0.793	0.278	0.936

<sup>1</sup> BPAA = Dieta baja en PC (14%) adicionada con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-Trp y L-Fen; BPAA+N = Como en BPAA y adicionada con Gli como fuente de N no esencial; MPAA = Nivel de PC intermedio (16%) adicionada con L-Lis, L-Tre, DL-Met; AP = Alta en proteína (22%)

<sup>2</sup> Contraste 1(C1)=BPAA vs BPAA+N; Contraste 2(C2) BPAA vs MPAA; Contraste 3 (C3) = BPAA

<sup>3</sup> Relación ganancia:consumo

No hubo efecto del nivel y la forma (libre o asociada a proteína) en la cual se adiciono la proteína a la dieta sobre la GDP, CDA y relación ganancia:consumo ( $P>0.10$ ). La suplementación de nitrógeno no esencial (Gli) a la dieta BPAA no afectó el comportamiento productivo ( $P>0.10$ ).

Peso de los componentes de la canal y órganos.

El peso de los componentes de la canal de los cerdos al inicio del experimento fue 10.1 kg para la canal completa, 3.3 kg de pierna con hueso, 2.55 kg de músculos de la pierna, 1.4 kg del musculo del lomo, 7.85 kg de musculo total, y 0.53 kg de tejido graso total. Estos valores fueron utilizados para estimar el peso inicial de los componentes de la canal. El peso final y el contenido relativo de los componentes de la canal son presentados en el cuadro 9. No hubo efecto de tratamiento en el peso total de la canal y componentes de la misma ( $P\geq 0.632$ ); el contenido relativo tampoco fue afectado ( $P\geq 0.499$ ). La ganancia diaria de peso promedio de la canal y de sus componentes (Cuadro 10) no fue afectada por los tratamientos ( $P\geq 0.414$ ).

Con base en el contenido de proteína analizada en el musculo (20.5%), no se afectó la acumulación diaria de proteína promedio ( $P=0.529$ ). Además, no hubo diferencias ( $P\geq 0.294$ ) en el peso de los órganos del tracto gastrointestinal así como hígado, riñón, corazón y bazo (Cuadro 11) entre los cerdos alimentados con la dieta BPAA o MPAA.

El peso del intestino grueso ( $P=0.001$ ) y riñón ( $P=0.005$ ) fueron mayores en los cerdos alimentados con la dieta AP comparados con los cerdos bajo el tratamiento BPAA; en cambio el bazo tuvo una tendencia a ser más pequeño ( $P=0.073$ ) en los cerdos alimentados con la dieta AP. El peso relativo (% del peso vivo) del intestino

grosso ( $P=0.001$ ), riñón ( $P=0.009$ ), estomago ( $P=0.050$ ) fueron mayores en cerdos alimentados con la dieta AP comparado con aquellos que recibieron la dieta BPAA.

Cuadro 9. Peso final (kg) y contenido relativo (% del peso de la canal) de los componentes de la canal de los cerdos por tratamiento<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup> Ocho cerdos por tratamiento fueron sacrificados al final del experimento. Cerdos del tratamiento BPAA+N no fueron sacrificados

<sup>2</sup>BPAA=Dieta baja en proteína (14%) suplementada con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen; BPAA+N = Como en el tratamiento BPAA además de L-Glu como fuente de N; MPAA = Dieta con contenido de PC intermedio (16%) adicionada con L-Lis, L-Tre y DL-Met; AP = Dieta alta en PC (22%).

Cuadro 10. Efecto del tratamiento sobre la ganancia diaria de peso de los componentes de la canal, canal completa y acumulación diaria total de proteína en cerdos (g/d)<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>Ocho cerdos por tratamiento fueron sacrificados al final del experimento. Cerdos del tratamiento BPAA+N no fueron sacrificados

<sup>2</sup>BPAA=Dieta baja en proteína (14%) suplementada con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen; BPAA+N = Como en el tratamiento BPAA además de L-Glu como fuente de N; MPAA = Dieta con contenido de PC intermedio (16%) adicionada con L-Lis, L-Tre y DL-Met; AP = Dieta alta en PC (22%)

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

### Concentración de aminoácidos en suero

La concentración en suero postprandial (CS) de AA en cerdos alimentados con la dieta BPAA o AP se presentan en el Cuadro 12. La CS de Arg ( $P=0.037$ ), His ( $P=0.015$ ), Iso ( $P=0.007$ ), Leu ( $P=0.024$ ), Fen ( $P=0.006$ ), y Val ( $P=0.017$ ) fueron más altos en cerdos alimentados con la dieta AP. Por el contrario, la CS de Lis ( $P<0.001$ ) y Met ( $P=0.003$ ) fueron más altos en cerdos alimentados con la dieta BPAA. Sin embargo la CS de Tre no fue diferente entre tratamientos ( $P=0.678$ ). En relación a AA no esenciales, la CS de Glu fue más baja ( $P<0.05$ ) en cerdos alimentados con la dieta AP;

la CS de Asp y Ser fueron más altos ( $P < 0.01$ ); y la CS de Gln tuvo una tendencia a ser más baja ( $P < 0.10$ ) para este tratamiento. No se observó diferencias ( $P > 0.01$ ) en la CS de Ala, Asp, Gli, y Pro entre tratamientos.

Cuadro 11. Efecto de los tratamientos sobre el peso de las vísceras de los cerdos<sup>1</sup>

Concepto	Tratamientos <sup>2</sup>				Valores de $P^3$	
	BPAA	MPAA	AP	EEM	BP-MP	BP-AP
Intestino delgado	1596	1551	1733	129.7	0.812	0.476
Intestino grueso	756	749	1084	46.7	0.912	0.001
Hígado	1.131	1239	1118	54.9	0.200	0.863
Riñón	221	230	268	8.7	0.496	0.005
Corazón	224	219	209	12.5	0.784	0.419
Estómago	299	315	370	24.9	0.810	0.294
Bazo	91	89	80	7.1	0.655	0.073
	Peso relativo, % del peso vivo					
Intestino delgado	3.71	3.5	4.04	0.293	0.621	0.45
Intestino grueso	1.75	1.69	2.53	0.096	0.709	0.001
Hígado	2.62	2.79	2.61	0.110	0.294	0.962
Riñón	0.51	0.54	0.6	0.020	0.352	0.009
Corazón	0.52	0.49	0.49	0.025	0.540	0.418
Estómago	0.69	0.71	0.86	0.054	0.801	0.050
Bazo	0.21	0.2	0.19	0.016	0.669	0.298

<sup>1</sup>Cuatro cerdos por tratamiento fueron sacrificados al final del experimento

<sup>2</sup>BPAA=Dieta baja en proteína (14%) suplementada con L-Lis, L-Tre, DL-Met, L-Leu, L-Iso, L-Val, L-His, L-Trp y L-Fen; BPAA+N = Como en el tratamiento BPAA además de L-Glu como fuente de N; MPAA = Dieta con contenido de PC intermedio (16%) adicionada con L-Lis, L-Tre y DL-Met; AP = Dieta alta en PC (22%)

<sup>3</sup>Contrastes: BP-MP= dieta BPAA vs dieta MPAA; BP-AP = dieta BPAA vs dieta AP

### 3.2.6.- DISCUSIÓN

La reducción del nivel de PC en dos o cuatro unidades porcentuales en la dieta para cerdos por debajo del nivel que cubre los requerimientos de Lis y acoplado con la adición de L-Lis y L-Tre libre no afectó el comportamiento productivo (Tuitoek *et al.*, 1997; Le Bellego *et al.*, 2002). Sin embargo, al reducir el nivel de PC en cuatro o más unidades porcentuales en dietas maíz o sorgo-pasta de soya hay una reducción del comportamiento productivo y un incremento en el espesor de la grasa dorsal (Tuitoek *et al.*, 1997; Kerr y Easter, 1995; Guay *et al.*, 2006). Se considera que algunos de los siguientes factores son los responsables de la reducción del desempeño productivo en cerdos alimentados con dietas bajas en proteína, tales como: a) el sistema de energía (ME vs NE) utilizado para la formulación de raciones (Noblet *et al.*, 1994), b) El contenido de energía en la dieta (Kerr *et al.*, 2003), y c) el perfil de aminoácidos y el sistema de alimentación utilizado, restringido vs libre acceso (Yen *et al.*, 2004). En este experimento, los cerdos tuvieron el alimento *ad libitum*. Todas las dietas fueron formuladas utilizando los valores de EN. La dieta BPAA fue balanceada para una relación óptima entre todos los AA esenciales y Lis total, excepto para Arg. Todas las dietas se formularon de acuerdo con el concepto de proteína ideal (NRC, 2012). La reducción del contenido de PC de alrededor de seis (MPAA) y ocho (BPAA) unidades porcentuales en el presente estudio no afectó la GDP, CDA y la relación ganancia:consumo en cerdos en crecimiento. De igual manera, la composición de la canal y acumulación de proteína tampoco fue afectada por los tratamientos. De manera similar Kerr *et al.* (2003) no encontraron diferencias en GDP y composición de la canal entre cerdos alimentados con dietas alta y baja en proteína cruda conteniendo niveles

similares de EN. Resultados similares en comportamiento productivo fueron reportados por Yi *et al.* (2010).

Cuadro 12. Concentración sérica postprandial de AA libres (mg/100 mL) en cerdos en crecimiento alimentados con la dieta BPAA o AP.

Aminoácido	BPAA	AP	EEM	Valores de <i>P</i>
AA esenciales				
Arg	2.66	4.74	0.55	0.037
His	0.93	1.80	0.18	0.015
Iso	1.69	3.09	0.25	0.007
Leu	2.55	3.41	0.27	0.024
Lis	4.85	1.79	0.27	0.000
Met	0.81	0.25	0.08	0.003
Fen	1.34	2.46	0.19	0.006
Tre	2.19	2.02	0.27	0.678
Val	3.15	4.48	0.30	0.017
AA no esenciales				
Ala	9.72	8.67	0.67	0.324
Asn	0.74	1.65	0.15	0.006
Asp	0.26	0.24	0.03	0.580
Gln	9.88	8.47	0.49	0.090
Glu	4.15	2.01	0.46	0.016
Gli	7.20	7.55	0.50	0.639
Pro	5.17	5.76	0.77	0.612
Ser	2.04	3.51	0.23	0.004

Se reportó que la composición de la dieta afecta el peso de algunos órganos del tracto gastrointestinal de los cerdos (Yen, 1997; Opapeju *et al.*, 2008). En el presente experimento, el peso del intestino grueso y riñón de los cerdos alimentados con dietas



altas en proteína fueron alrededor de 43 y 21 % más pesada comparado con los cerdos alimentados con la dieta BPAA, respectivamente. Resultados similares fueron publicados por Nieto *et al.* (2003) en cerdos ibéricos alimentados con dietas entre el rango de 10 y 22% de PC. En este experimento los cerdos alimentados con la dieta AP consumieron 60% de nitrógeno en exceso (NRC, 2012). Lo anterior, se presume ocasiono un incremento de peso del riñón como una consecuencia del incremento en la actividad renal para eliminar el exceso de nitrógeno y/o AA consumidos en la dieta AP. El incremento en el peso de los órganos de los cerdos alimentados con la dieta AP pudiera explicar la mayor GDP observada cuando se compara con los cerdos alimentados con dietas bajas en proteína suplementada con AA. De acuerdo con el NRC, (2012), el requerimiento de nitrógeno no esencial total en base DIE para cerdos en crecimiento es de 2.11%, la dieta AP utilizada en este experimento contenía 2.51% de nitrógeno no esencial en base a DIE, la cual excedió la recomendación en 16%. Por otra parte, la dieta BPAA cubrió de manera satisfactoria el requerimiento de nitrógeno no esencial (2.20%). Además, en dietas formuladas a base maíz-pasta de soya adicionadas con altos niveles de AA libres parece que algunos AA no esenciales tales como Gli son requeridos en una relación óptima entre Gli y los primeros cinco AA limitantes (Kendall *et al.*, 2004). Sin embargo en este experimento la suplementación de Gli a la dieta BPAA (incremento del 16% de nitrógeno en base a DIE) no afecto la GDP, CDA, y la relación ganancia:consumo respecto a los demás tratamientos. Se ha documentado que las dietas formuladas con una proporción Lis total:PC no mayor al 7.1% provee suficiente nitrógeno no esencial para cerdos en crecimiento (Ratliff *et al.*, 2005). En este estudio la dieta BPAA tuvo una proporción Lis total: PC de 7.0% sugiriendo que se suministró suficiente nitrógeno. El contenido de nitrógeno no esencial

y Gli en trigo es alrededor de 25% mayor al maíz (Lin *et al.*, 1987) lo cual pudiera explicar la falta de respuesta a la adición de Gli a la dieta BPAA. Por tanto estos resultados pudieran indicar que la dieta BPAA (base trigo-PS) utilizada en el presente experimento suministró suficiente nitrógeno no esencial en base DIE y Gli para cerdos en el rango de 24 a 40 kg.

La diferencia en la velocidad de absorción de los AA depende de la forma en que se adicionen en la dieta; se reportó que los AA libres aparecen más rápido en sangre portal en comparación con los AA asociados a proteína (Yen *et al.*, 2004). También se conoce que la CS de AA durante las primeras 3 horas postprandial reflejan la composición de AA en la dieta consumida por los cerdos (Langer y Fuller, 2000; García-villalobos *et al.*, 2012). En este experimento la concentración de Lis total en la dieta no fue diferente entre tratamientos, pero esta fue adicionada en forma libre en mayor proporción en la dieta BPAA, la cual represento alrededor del 65% de Lis en forma libre comparado con el 100% de Lis asociado a proteína en la dieta AP. La CS de Lis en cerdos alimentados con la dieta BPAA fue alrededor de 63% más alta comparado con la dieta AP. La mayor CS de Met se explica por el mayor contenido de Met libre en la dieta BPAA. Aunque el contenido de Tre libre en la dieta BPAA fue elevada, la CS de Tre en plasma no fue diferente entre tratamientos, debido a que Tre es metabolizada principalmente en intestino delgado (Schaart *et al.*, 2005). El contenido total de Arg, His, Iso, Leu, Fen, Tre, y Val fueron entre 26 % (Tre) y 95% (Arg) mal altos en la dieta AP comparado con la dieta BPAA. De igual manera, la CS de Arg, His, Iso, Leu, Fen, Tre, y Val en cerdos alimentados con la dieta AP fueron entre 33 (Leu) y 94% (His) mayores que en los cerdos alimentados con la dieta BPAA. Estas respuestas concuerdan con lo

reportado por Zhang *et al.* (2013). La diferencia de disponibilidad de AA entre dietas bajas en proteína suplementadas con AA libres *versus* AA asociados a proteína en dietas altas en proteína parecen explicar el pobre desempeño productivo. Por tanto, la diferencia en la tasa de absorción entre AA libres y asociados a proteína pudiera inducir oxidación (Rerat *et al.*, 1992) y reducir la disponibilidad de los primeros cuando los cerdos son alimentados una vez por día (Yen *et al.*, 2004), no así cuando son alimentados *ad libitum*. La discrepancia entre nuestros resultados y los de Guay *et al.* (2006), quienes reportaron un desempeño productivo pobre en cerdos alimentados con 6 unidades porcentuales por debajo del nivel del control pudiera ser atribuido al hecho de que los cerdos fueron alimentados dos veces al día. Los resultados de este experimento indican que la concentración en suero refleja la composición de AA en la dieta así como la forma en la cual son consumidos y por otra parte pudiera reflejar la diferencia en abundancia y actividad de los transportadores localizados en cada segmento del intestino delgado. En resumen, los datos de comportamiento productivo y composición de la canal así como la CS de AA, indican que los cerdos alimentados *ad libitum* pueden utilizar dietas bajas en proteína suplementadas con AA de manera similar a aquellos alimentados con dietas altas en proteína cruda.

### 3.2.7.- CONCLUSIÓN

La adición de aminoácidos libres en la dieta permiten la reducción del contenido de proteína cruda (hasta en ocho unidades porcentuales) sin afectar el comportamiento productivo y la composición de la canal de cerdos en crecimiento alimentados *ad libitum* con dietas formuladas a base trigo-pasta de soya utilizando el sistema de energía neta y el concepto de proteína ideal.

#### **4.- CONCLUSIÓN GENERAL**

El uso de dietas bajas en proteína suplementadas con aminoácidos libres tiene un enorme potencial en la alimentación porcina. Esta modificación en el suministro de aminoácidos trae consigo la modificación de la actividad enzimática pancreática, expresión de los transportadores de aminoácidos en el intestino delgado y concentración de aminoácidos en suero. Además, este cambio a la dieta permite la reducción del nivel de proteína hasta en ocho unidades porcentuales sin afectar el comportamiento productivo y la composición de la canal de cerdos en crecimiento alimentados *ad libitum*.

## LITERATURA CITADA

- AOAC. 2006. Official methods of anaLisis. 18th ed. AOAC Int., Arlington, VA.
- Asche, G. L., A. J. Lewis, and E. J. Peo. 1989. Protein digestion in weanling pigs: effect of dietary protein source. *J. Nutr.* 119:1093-1099.
- Baumler, M. D., M. C. Koopmann, D. H., Thomas, D. M. Ney, and G. E. Groblewski. 2010. Intravenous or luminal amino acids are insufficient to maintain pancreatic growth and digestive enzyme expression in the absence of intact dietary protein. *Am. J. Physiol-Gastr. L.* 62:G338. doi:10.1152/ajpgi.00165.2010.
- Boudko, D. Y., A. B. Kohn, E. A. Meleshkevitch, M. K. Dasher, T. J. Seron, B. R. Stevens, and W. R. Harvey. 2005. Ancestry and progeny of nutrient amino acid transporters. *P. Natl. Acad. Sci.* 102:1360–1365. doi.org/10.1073/pnas.0405183101.
- Bröer, A. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88:249–286. doi:10.1152/physrev.00018.2006.
- Camargo, S. M. R., D. Singer, V. Makrides, K. Huggel, K. M. Pos, C.A. Wagner, K. Kuba, U. Danilczyk, F. Skovby, R. Kleta, J. M. Penninger, and F. Verrey. 2009. Tissue-specific amino acid transporter partners ACE2 and collectrin differentially interact with hartnup mutations. *Gastroenterology* 136:872-82. doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.055.
- Carter, S. D., G. L. Cromwell, M. D. Lindemann, L. W. Turner, and T. C. Bridges. 1996. Reducing N and P excretion by dietary manipulation in growing and finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 74(Suppl. 1):59 (Abstr.).
- Cervantes, M., N. Arce, H. García, M. Cota, J. K. Htoo, and A. Morales. 2015. Expression of genes coding for selected amino acid transporters in small intestine, liver, and skeletal muscle of pigs fed excess branched-chain amino acids. *Genetic. Mol. Res.* 14:9779-92. doi.org/10.4238/2015.August.19.11.
- Closs, E. I., J.-P. Boissel, A. Habermeier, y A. Rotmann. 2006. Structure and Function of Cationic Amino Acid Transporters (CATs). *J. Membrane Biol.* 213:67–77.

- Commission Directive. 1998. Establishing community methods for 434 the determination of amino acids, crude oils and fats, and olan-quindox in feeding stuff and amending Directive 71/393/EEC, annex part A, Determination of amino acids. *Offic. J. L257:14–23.*
- Commission Directive. 2000. Establishing community methods for the determination of vitamin A, vitamin E and tryptophan, annex part C. Determination of tryptophan. *Offic. J. L174:45–50.*
- Dagorn, J. C., and R. G. Lahaie. 1981. Dietary regulation of pancreatic protein synthesis. I. Rapid and specific modulation of enzyme synthesis by changes in dietary composition. *Biochim. Biophys. Acta* 654:111-118.
- Dave, M. H., N. Schulz, M. Zecevic, C. A. Wagner, and F. Verrey. 2004. Expression of heteromeric amino acid transporters along the murine intestine. *J. Physiol.* 558:597-610.
- Deng, D., R. L. Huang, T. J. Li, G. Y. Wu, M. Y. Xie, Z. R. Tang, P. Kang, Y. M. Zhang, M. Z. Fan, X. F. Kong, Z. Ruan, H. Xiong, Z. Y. Deng and Y. L. Yin. 2007. Nitrogen balance in barrows fed low-protein diets supplemented with essential amino acids. *Livest. Sci.* 109:220-223. doi:10.1016/j.livsci.2007.01.122.
- Deng, D., K. Yao, W. Chu, T. Li, R. Huang, Y. Yin, Z. Lui, J Zhang and G. Wu. 2009. Impaired translation initiation activation and reduced protein synthesis in weaned piglets fed a low-protein diet. *J. Nutr. Biochem.* 20:544-552. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.05.014.
- Emery, P. W. 2012. *Basic Metabolism: Protein. Surgery (Oxford)* 30:209–13. doi.org/10.1016/j.mpsur.2012.02.008.
- Figueroa, J. L., A. J. Lewis, P. S. Miller, R. L. Fischer, R. S. Gomez, and R. M. Diedrichsen. 2002. Nitrogen metabolism and growth performance of gilts fed standard corn-soybean meal diets or low-crude protein, amino acid-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 80:2911–2919.
- Figueroa, J. L., A. J. Lewis, P. S. Miller, R. L. Fischer, and R. M. Diedrichsen. 2003. Growth, carcass traits, and plasma amino acid concentrations of gilts fed low-

- protein diets supplemented with amino acids including histidine, isoleucine, and valine. *J. Anim. Sci.* 81:1529–1537.
- Gallo, L., G. Dalla Montà, L. Carraro, A. Cecchinato, P. Carnier, and S. Schiavon. 2015. Carcass quality and uniformity of heavy pigs fed restrictive diets with progressive reductions in crude protein and indispensable amino acids. *Livest. Sci.* 172:50–58. doi.org/10.1016/j.livsci.2014.11.014.
- Ganapathy, V. 2012. Protein digestion and absorption. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Elsevier Inc. 2:1595-1623. doi:10.1016/B978-0-12-382026-6.00059-2.
- Garcia-Launay, F., H. M. G. Van der Weff, T. T. H. Nguyen, L. Le Tutour and J. Y. Dourmad. 2014. Evaluation of the environmental implications of the incorporation of free-use amino acids in pig production using life cycle assessment. *Livest. Sci.* 161:158-175. doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.027.
- García-Villalobos, H., A. Morales-Trejo, B. A. Araiza-Piña, J. K. Htoo, and M. Cervantes-Ramírez. 2012. Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 66:257–270. doi:10.1080/1745039X.2012.697351.
- Gilbert, E.R., H. Li, and D. A. Emmerson. 2008. Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. *J. Nutr.* 138:262–271.
- Gloaguen, M., N. L. Floc'h, E. Corrent, Y. Primot, and J. V. Milgen. 2014. The use of free amino acids allows formulating very low crude protein diets for piglets. *J. Anim. Sci.* 92:637-644. Doi:10.2527/jas.2013-6514.
- Goodman, B. E. 2010. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Am. J. Physiol.-Adv. Physiol. Edu.* 34:44–53. doi.org/10.1152/advan.00094.2009.
- Green, G. M., B. A. Olds, G. Matthews, and R. L. Lyman. 1973. Protein as a regulator of pancreatic enzyme secretion in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142:1162-1167.

- Guay, F., S. M. Donovan, and N. L. Trottier. 2006. Biochemical and morphological developments are partially impaired in intestinal mucosa from growing pigs fed reduced-protein diets supplemented with crystalline amino acids. *J. Anim. Sci.* 84:1749–1760. doi:10.2527/jas.2005-558.
- He, L., H. Yang, Y. Hou, T. Li, J. Fang, X. Zhou, Y. Yin, L. Wu, M. Nyachoti and G. Wu. 2013. Effects of dietary L-Lisine intake on the intestinal mucosa and expression of CAT genes in weaned piglets. *Amino Acids* 45:383-391. doi:10.1007/s00726-013-1514-0.
- He, L., L. Wu, Z. Xu, T. Li, K. Yao, Z. Cui, Y. Yin, and G. Wu. 2015. Low-protein diets affect ileal amino acid digestibility and gene expression of digestive enzymes in growing and finishing pigs. *Amino Acids* doi.org/10.1007/s00726-015-2059-1.
- Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2008. Effects of feeding low protein diets to piglets on plasma urea nitrogen, faecal ammonia nitrogen, the incidence of diarrhoea and performance after weaning, *Arch. Anim. Nutr.* 62:343-358. doi: 10.1080/17450390802327811.
- Hummel, B. C. W., 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Phys.* 37:1393-1399.
- Imondi, A. R., and F. H. Bird. 1967. Effects of dietary protein level on growth and proteolytic activity of the avian pancreas. *J. Nutr.* 91:421-428.
- Jones, C. K., M. D. Tokach, J. L. Usry, C. R. Neill, and J. F. Patience. 2014. Evaluating lysine requirements of nursery pigs fed low protein diets with different sources of nonessential amino acids. *J. Ani. Sci.* 92:3460–3470. doi.org/10.2527/jas.2014-7018.
- Kendall, D. C., R. W. Fent, J. L. Usry, and G. L. Allee. 2004. The essentiality of nonessential amino acids in low protein diet formulations for 11 to 30 kg barrows. *J. Anim. Sci.* 82(Suppl. 2):125 (Abstr.).
- Kerr, B. J., and R. A. Easter. 1995. Effect of feeding reduced protein, amino acid-supplemented diets on nitrogen and energy balance in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 73:3000–3008.



- Kerr, B. J., L. L. Southern, T. D. Bidner, K. G. Friesen, and R. A. Easter. 2003. Influence of dietary protein level, amino acid supplementation, and dietary energy levels on growing-finishing pig performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 81:3075–3087.
- Kinouchi, T., S. Koyama, E. Harada, and T. Yajima. 2012. Large molecule protein feeding during the suckling period is required for the development of pancreatic digestive functions in rats. *Am. J. Physiol-Reg. I.* 303:1268-1276. doi:10.1152/ajpregu.00064.2012.
- Lambe, N. R., J. D. Wood, K. A. McLean, G. A. Walling, H. Whitney, S. Jagger, P. Fullarton, J. Bayntun, and L. Bünger. 2013. Effects of low protein diets on pigs with a lean genotype 2. Compositional traits measured with computed tomography (CT). *Meat Sci.* 95:129–136. doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.038.
- Langer, S., and M. F. Fuller. 2000. Interactions among the branched chain amino acids and their effects on methionine utilization in growing pigs: Effects on nitrogen retention and amino acid utilization. *Br. J. Nutr.* 83:49–58. doi:10.1017/S0007114500000088.
- Le Bellego, L., J. van Milgen, and J. Noblet. 2002. Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 80:691–701.
- Lewis, A. J. 2001. Amino acid in swine nutrition. In: *Swine nutrition* (Lewis, A. J. and L. L. Southern). 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press LLC. P. 131-150.
- Liao, S. F., E. S. Vanzant, D. L. Harmon, K. R. McLeod, J. A. Boiling, and J. C. Matheus. 2009. Ruminal and abomasal starch hydrolysate infusions selectively decrease the expression of cationic amino acid transporter mRNA by small intestinal epithelia of forage-fed beef steer. *J. Dairy Sci.* 92:1124–1135. doi:10.3168/jds.2008-1521.
- Lin, F. D., D. A. Knabe, and T. D. Tanksley Jr. 1987. Apparent digestibility of amino acids, gross energy and starch in corn, sorghum, wheat, barley, oat groats and wheat middlings for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 64:1655–1663.

- Llames, C. R., and J. Fontaine. 1994. Determination of amino acids in feeds: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 77:1362–1402.
- Madrid, J., S. Martínez, C. López, J. Orengo, M. J. López, and F. Hernández. 2013. Effect of low protein diets on growth performance, carcass traits and ammonia emission of barrows and gilts. *Anim. Prod. Sci.* 53:146-153. doi:10.1071/AN12067.
- Méndez, V., E. Avelar, A. Morales, M. Cervantes, A. Araiza, and D. González. 2011. A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genet. Mol. Res.* 10:3251–3255. doi:10.4238/2011.December.22.3.
- Morales, A., M. A. Barrera, B. A. Araiza, R. T. Zijlstra, H. Bernal, and M. Cervantes. 2013. Effect of excess levels of lysine and leucine in wheat-based, amino acid-fortified diets on the mRNA expression of two selected cationic amino acid transporters in pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97:263–270. doi:10.1111/j.1439-0396.2011.01266.x.
- Morales, A., L. Buenabad, G. Castillo, N. Arce, B. A. Araiza, J. K. Htoo, and M. Cervantes. 2015. Low protein-amino acid supplemented diets for growing pigs: Effect on expression of amino acid transporters, serum concentration, performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 93:2154-2164. doi.org/10.2527/jas2014-8834.
- Morisset, J. and D. J. Dunning. 1971. Effects of glucose, amino Acids, and insulin on adaptation of exocrine pancreas to diet. *P. Soc. Exp. Biol. Med.* Vol. 136.
- Nemechek, J. E., M. D. Tokach, S. S. Dritz, R. D. Goodband, and J. M. Derouchey. 2014. Evaluation of standardized ileal digestible valine : lysine , total lysine : crude protein , and replacing fish meal , meat and bone meal , and poultry byproduct meal with crystalline amino acids on growth performance of nursery pigs from seven to twelve kilograms. *J. Anim. Sci.* 92:1548–1561. doi.org/10.2527/jas2013-6322.

- Nieto, R., L. Lara, M. A. García, M. A. Vílchez, and J. F. Aguilera. 2003. Effects of dietary protein content and food intake on carcass characteristics and organ weights of growing Iberian pigs. *Anim. Sci.* 77:47–56.
- Noblet, J., H. Fortune, H. S. Shi, and S. Dubois. 1994. Prediction of net energy value of feeds for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 72:344–354.
- NOM-062-ZOO-1999, 2001. Norma Oficial Mexicana. 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. 2012. Nutrient requirements of swine. 12th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Opapeju, F. O., M. Rademacher, G. Blank, and C. M. Nyachoti. 2008. Effect of low-protein amino acid-supplemented diets on the growth performance, gut morphology, organ weights and digesta characteristics of weaned pigs. *Animal* 2:1457–1464. doi.org/doi:10.1017/S175173110800270X.
- Palacín, M., R. Estévez, J. Bertran, and A. Zorzano. 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78:969–1054.
- Palacín, M. 2001. The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:328–335. doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00198-2.
- Powell, S., T. D. Bidner, R. L. Payne, and L. L. Southern. 2011. Growth performance of 20- to 50-kilogram pigs fed low-crude-protein diets supplemented with histidine, cystine, glycine, glutamic acid, or arginine. *J. Anim. Sci.* 89:3643–3650. doi.org/10.2527/jas.2010-3757.
- Prandini, A., S. Sigolo, M. Morlacchini, E. Grilli, and L. Fiorentini. 2014. Microencapsulated lysine and low-protein diets: effects on performance, carcass characteristics and nitrogen excretion in heavy growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 91:4226-4234. doi:10.2527/jas2013-6412.
- Partridge, I. G., A. G. Low, I. E. Sambrook, and T. Corring. 1982. The influence of diet on the exocrine pancreatic secretion of growing pigs. *Brit. J. Nutr.* 48:137-145.

- Pfeiffer, R., G. Rossier, B. Spindler, C. Meier, L. Kühn, and F. Verrey. 1999. Amino acid transport of  $\gamma$ -L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.* 18:49–57. doi.org/10.1093/emboj/18.1.49.
- Pierzynowski, S. G., V. Sileikiene, J. L. Valverde Piedra, S. Szymanczyk, P. C. Gregory, D. Kruszezwska, R. Mosenthin, A. Rzasa, S. Kowalik, and B. Weström. 2007. Ileal exposure to pig pancreatic juice and bile inhibit exocrine pancreatic secretion in pigs. *Livest. Sci.* 108: 53-56. doi:10.1016/j.livsci.2007.01.031.
- Ratliff, B. W., A. M. Gaines, P. Srichana, G. L. Allee, and J. L. Usry. 2005. Evaluation of high synthetic amino acid inclusion and supplemental arginine in starter diets. *J. Anim. Sci.* 83(Suppl. 2):69 (Abstr.).
- Rees, R. G. P., J. J. P. James, G. K. Grimble, D. Halliday, P. G. Frost, and D. B. A. Silk. 1992. Glycine nitrogen in total parenteral nutrition: Two prospective clinical trials comparing the efficacy of high and low glycine containing amino acid solutions. *Gut* 33:848–856. doi:10.1136/gut.33.6.848.
- Ren, L. Q., F. Zhao, H. Z. Tan, J. T. Zhao, J. Z. Zhang, and H. F. Zhang. 2012. Effects of dietary protein source on the digestive enzyme activities and electrolyte composition in the small intestinal fluid of chickens. *Poult. Sci.* 91:1641-1646. doi:10.3382/ps.2011-02081.
- Rerat, A., C. Simous-Nunes, F. Mendy, P. Vaissade, and P. Vaugelade. 1992. Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the non-anaesthetized pig. *Br. J. Nutr.* 68:111–138. doi:10.1079/BJN19920071.
- Rojas-García, R., and I. Ronnestad. 2003. Assimilation of dietary free amino acids, peptides and protein in post-larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mar. Biol.* 142: 801–808. doi.org/10.1007/s002270100675.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.

- Schaart, M. W., H. Schierbeek, S. R. D. van der Schoor, B. Stoll, D. G. Burrin, P. J. Reeds, and J. B. van Goudoever. 2005. Threonine utilization is high in the intestine of piglets. *J. Nutr.* 135:765–770.
- Schneeman, B. O., I. Chang, L. B. Smith, and R. L. Lyman. 1977. Effect of dietary amino acids, casein, and soybean trypsin inhibitor on pancreatic protein secretion in rats. *J. Nutr.* 107:281-288.
- Shikata, N., Y. Maki, Y. Noguchi, M. Mori, T. Hanai, M. Takahashi, and M. Okamoto. 2007. Multi-layered network structure of amino acids (AA) metabolism characterized by each essential AA-deficient condition. *Amino Acids* 33:113-121
- Stein, H. H., S. W. Kim, T. T. Nielsen, and R. A. Easter. 2001. Standardized ileal protein and amino acid digestibility by growing pigs and sows. *J. Anim. Sci.* 79:2113–2122.
- Sun, Y., Z. Wu, W. Li, C. Zhang, K. Sun, Y. Ji, B. Wang, N. Jiao, B. He, W. Wang, Z. Dai, and G. Wu. 2015. Dietary L-leucine supplementation enhances intestinal development in suckling piglets. *Amino Acids* 47:1517–1525. doi.org/10.1007/s00726-015-1985-2.
- Torras-Llort, M., J. F. Soriano-García, R. Ferrer, and M. Moretó. 1998. Effect of a lysine-enriched diet on L-lysine transport by the brush-border membrane of the chicken jejunum. *Am. J. Physiol.* 274:R69-R75.
- Torras-Llort, M., D. Torrents, J. F. Soriano-García, J. L. Gelpí, R. Estévez, R. Ferrer, M. Palacín, and M. Moretó. 2001: Sequential amino acid exchange across b<sup>0+</sup>-like system in chicken brush border jejunum. *J. Membrane Biol.* 180: 213–220.
- Tuitoek, J. K., L. G. Young, C. F. M. de Lange, and B. J. Kerr. 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.
- Valette, P., H. Malouin, T. Corring, L. Savoie, A. M. Gueugneau, and S. Berot. 1992. Effects of diets containing casein and rapeseed on enzyme secretion from the exocrine pancreas in the pig. *Br. J. Nutr.*, 67:215.

- Verrey, F., E. I. Closs, C. A. Wagner, M. Palacin, H. Endou, and Y. Kanai. 2004. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.* 447:532-542.
- Wang, X., P. Zeng, Y. Feng, C. Zhang, J. Yang, G. Shu, and Jiang, Q. 2012. Effects of dietary lysine levels on apparent nutrient digestibility and cationic amino acid transporter mRNA abundance in the small intestine of finishing pigs, *Sus scrofa*. *Anim. Sci. J. = Nihon Chikusan Gakkaihō* 83:148-155. doi:10.1111/j.1740-0929.2011.00941.x.
- Wood, J. D., N. R. Lambe, G. A. Walling, H. Whitney, S. Jagger, P. J. Fullarton, J. Bayntun, K. Hallet and L. Bünger. 2013. Effects of low protein diets on pigs with a lean genotype. 1. Carcass composition measured by dissection and muscle fatty acid composition. *Meat Sci.* 95:123-128. doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.03.001
- Wu G, L. A. Jaeger, F. W. Bazer, J. M. Rhoads. 2004. Arginine deficiency in premature infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. *J. Nutr. Biochem.* 15:442–51.
- Wu. L., L-Q. He, Z-J. Cui, G. Liu, K. Yao, F. Wu, J. Li, and T-J. Li. 2015. Effects of reducing dietary protein on the expression of nutrition sensing genes (amino acid transporters) in weaned piglets. *J. Zhejiang University-SCIENCE B*, 16:496–502. doi.org/10.1631/jzus.B1400259.
- Yang, H., D. Fu, H. Shao, X. Kong, W. Wang, X. Yang, C. M Nyachoti, and Y. Yin. 2012. Impacts of birth weight on plasma, liver and skeletal muscle neutral amino acid profiles and intestinal amino acid transporters in suckling Huanjiang mini-piglets. *PloS One*, 7(12), e50921. doi.org/10.1371/journal.pone.0050921.
- Yen, J. T. 1997. Oxygen consumption and energy flux of porcine splanchnic tissues. In: J. P. Laplace, C. Fevrier, and A. Barbeau, editors, *Digestive physiology in pigs: Proc. 7th Int. Symp. Digest. Physiol. Pigs. EAAP Publ. No. 88. Inst. Natl. Rech. Agron., Saint Malo, France.* p. 260–269.

- Yen, J. T. 2001. Anatomy of the digestive system and nutritional physiology. *Swine Nutrition*, 31-64. doi:10.1201/9781420041842.ch3.
- Yen, J. T., B. J. Kerr, R. A. Easter, and A. M. Parkhurst. 2004. Difference in rates of net portal absorption between crystalline and protein-bound Lysine and threonine in growing pigs fed once daily. *J. Anim. Sci.* 82:1079–1090.
- Yi, X. W., S. Zhang, Q. Yang, H. Yin, and S. Y. Qiao. 2010. Influence of dietary net energy content on performance of growing pigs fed low crude protein diets supplemented with crystalline amino acids. *J. Swine Health Prod.* 18:294–300.
- Yue, L. Y., and S. Y. Qiao. 2008. Effects of low-protein diets supplemented with crystalline amino acids on performance and intestinal development in piglets over the first 2 weeks after weaning. *Livest. Sci.* 115:144–152. doi:10.1016/j.livsci.2007.06.018.
- Zervas, S., and R. T. Zijlstra. 2002. Effects of dietary protein and oat hull fiber on nitrogen excretion patterns and postprandial plasma urea profiles in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 80:3238–3246.
- Zhang, S., S. Qiao, M. Ren, X. Zeng, X. Ma, Z. Wu, P. Thacker, and G. Wu. 2013. Supplementation with branched-chain amino acids to a low-protein diet regulates intestinal expression of amino acid and peptide transporters in weanling pigs. *Amino Acids* 45:1191–1205. doi:10.1007/s00726-013-1577-y.