



Nota corta [Short note]

DIETAS BAJAS EN PROTEÍNA ADICIONADAS CON AMINOÁCIDOS LIBRES: COMPORTAMIENTO Y EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EN CERDOS

[LOW PROTEIN, AMINO ACIDS SUPPLEMENTED DIETS: PERFORMANCE AND EXPRESSION OF AMINO ACIDS TRANSPORTERS IN PIGS]

C.L. Buenabad, L.G. Castillo, V.N. Arce, M.M Cota, P.B.A. Araiza, T.A. Morales and R.M. Cervantes*

Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California.

Email: miguel.cervantes@sia.mx.uabc.mx

**Corresponding author*

RESUMEN

Se utilizaron 24 cerdos (21.6 kg de peso vivo inicial) distribuidos en cuatro tratamientos para evaluar el efecto de la forma (libre vs. proteína intacta) en que se incorporan aminoácidos (AA) a dietas sobre expresión de transportadores de AA en intestino delgado y comportamiento productivo. Los tratamientos fueron las siguientes dietas: 1, trigo + AA libres (AAL); 2, como en 1 + nitrógeno no esencial (AAL+NNE); 3, trigo + pasta de soya (PS) + AA libres (T-PS+AAL); y 4, trigo-PS (T-PS). Al final del experimento se sacrificaron 8 cerdos (4 AAL y 4 T-PS) para tomar muestras de mucosa intestinal. No hubo diferencia ($P>0.10$) en ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia entre tratamientos. En duodeno, la expresión de $b^{0,+}$ fue mayor en cerdos con la dieta T-PS ($P=0.036$); en íleon, y^{+L} tendió a ser superior en cerdos con AA libres ($P=0.098$). La expresión de todos los transportadores fue mayor en yeyuno que en duodeno o íleon. Estos resultados indican que pueden sustituirse hasta 8 unidades porcentuales de proteína por AA libres en dietas T-PS sin afectar el comportamiento de cerdos y que el NNE no parece ser limitante en dietas bajas en proteína para cerdos en crecimiento. Además, la forma en que se incluyen AA en la dieta afecta la expresión de algunos transportadores de AA en intestino delgado de cerdos.

Palabras clave: Proteína; transportadores; ganancia de peso.

INTRODUCCIÓN

Con la finalidad de reducir la excreción de nitrógeno en las excretas se ha planteado la reducción del

SUMMARY

Twenty four pigs (21.6 kg initial BW) distributed in four treatments were used to evaluate the effect of the form (free vs. intact protein) in which AA are added to diets on performance and expression of AA transporters in the small intestine. Dietary treatments were: 1, wheat + free AA (FAA); 2, as in 1 + non-essential nitrogen (NEN); 3, wheat-soybean meal (SBM) + free AA (W-SBM+FAA); 4, wheat-SBM (W-SBM). At the end of the experiment eight pigs (four FAA and 4 W-SBM) were sacrificed to collect intestinal mucosa samples. There were no differences in average daily gain, feed intake and feed conversion between dietary treatments ($P>0.10$). In duodenum, expression of $b^{0,+}$ was higher in pigs fed the W-SBM diet ($P=0.036$). In ileum, y^{+L} expression tended to be higher in pigs with the FAA diet ($P=0.098$). Expression of all transporters was higher in jejunum than in duodenum or ileum. These results indicate that FAA can substitute up to eight percentage units of protein in W-SBM diets without affecting pig performance; NEN does not seem to be limiting in very low protein diets for growing pigs. Also, the form in which AA are included in the diet affects the expression of some AA transporters in the small intestine of pigs.

Key words: Protein; transporters; live weight gain.

contenido de proteína en dietas para cerdos y complementarlas con AA cristalinos para cubrir los requerimientos de los AA limitantes (NRC, 1998). Sin embargo, el desempeño productivo de cerdos en

crecimiento alimentados con dietas bajas en proteína no ha sido consistente. Reducciones menores de cuatro unidades porcentuales en dietas maíz-PS no afectaron el desempeño y características de la canal de cerdos en finalización (Le Bellego et al., 2002). Barrera et al. (2004) encontraron que lisina y treonina cristalinas pueden reemplazar completamente a la PS en dietas a base de trigo para cerdos en crecimiento sin afectar su comportamiento. Otros reportes muestran una disminución en el comportamiento y un aumento en la grasa dorsal cuando el contenido de proteína se reduce en más de cuatro puntos porcentuales en dietas a base de maíz-PS y sorgo-PS (Yue and Qia, 2008).

El transporte de AA en las células epiteliales del intestino se realiza a través de proteínas transportadoras que varían en especificidad, abundancia y actividad. El mayor transportador de AA catiónicos en intestino delgado es el $b^{0,+}$ AT, mientras que el sistema B^0 es el principal transportador de AA neutros (Broer. *et al* 2004). Ambos transportadores se encuentra en la membrana apical del enterocito El transportador y^+L se expresa generalmente en la membrana basolateral del intestino delgado (Palacín et al., 2001). Los sistemas $b^{0,+}$ AT y y^+L funcionan como intercambiadores de AA catiónicos (lisina) por AA neutros (leucina). Estudios recientes de este laboratorio indican que el nivel de AA en la dieta afecta la expresión de transportadores específicos (García-Villalobos et al., 2012; Morales et al., 2013). Debido a que los AA en proteínas intactas de la dieta están disponibles para absorción en intestino delgado varios minutos después que AA libres, se especula que la abundancia de sus transportadores es diferente que cuando se incorporan en forma libre. El objetivo de este estudio consistió en analizar el efecto de la forma, libre o proteína intacta, en que se suministran AA en las dietas, sobre el comportamiento y expresión de transportadores $b^{0,+}$, y^+L y B^0 en intestino delgado de cerdos en crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron veinte cuatro cerdos cruzados (Landrace x Duroc; 21.6 kg de peso inicial) distribuidos al azar en cuatro tratamientos con base en peso inicial, sexo, y camada, con seis repeticiones cada uno. Los cerdos se manejaron siguiendo las especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999,2001). Estos se alojaron de manera individual en jaulas elevadas con piso de malla metálica (1.2 m ancho, 1.2 m largo) equipadas con comederos automáticos de acero inoxidable y bebederos de tipo chupón. El alimento y agua se ofrecieron a libre acceso. Los cerdos se pesaron cada 7 días para calcular la ganancia diaria de

peso (GDP). El consumo de alimento (CDA) y la conversión alimenticia (CA) también se midieron con esa frecuencia. Las dietas experimentales (Tabla 1) se elaboraron a base de trigo y pasta de soya (T-PS) complementadas con AA libres, vitaminas y minerales. Los tratamientos fueron las siguientes dietas: 1, dieta T-PS + AA libres, 14% PC (AAL); 2, como en 1 + nitrógeno no esencial (AAL+NNE); 3, T-PS + AA libres, 16.4% PC (T-PS-AAL); y 4, T-PS, 21.7% PC. Se realizaron análisis de varianza y se construyeron tres contrastes para evaluar el efecto de adicionar NNE (C_1 , AAL vs. AA+NNE) y forma de inclusión de AA en dos niveles de proteína cruda (C_2 , AAL vs. T-PS+AAL; C_3 , AAL vs. T-PS). Al término del experimento, se sacrificaron 8 cerdos (4 AAL y 4 T-PS) y se obtuvieron muestras de mucosa de duodeno, yeyuno e íleon para realizar extracción total de RNA y analizar la abundancia del mRNA de cada transportador. Se utilizó la técnica de PCR cuantitativo para determinar la expresión de los transportadores de AA catiónicos ($b^{0,+}$, y^+L) y neutros (B^0). Se diseñaron oligonucleótidos específicos de cada transportador de acuerdo con las secuencias publicadas en el Genbank (Tabla 2). El valor de $P < 0.05$ se considera significativo y $P > 0.05$ y < 0.10 se considera tendencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de comportamiento productivo se muestran en la tabla 3. No se observó efecto de la reducción en el nivel de PC (8%) ni en la forma en que se incluyeron los AA en la dieta, la GDP, CDA y CA ($P > 0.10$). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Barrera et al. (2004) y Myer *et al.*, (1996) para cerdos en crecimiento, y por Knowles et al., (1998) y Le Bellego et al., (2002) para la etapa de finalización. Sin embargo, son contrarios a lo reportado por Yue and Qia, (2008) en cerdos con dietas maíz- o sorgo-pasta de soya, donde la reducción de más de 4 unidades porcentuales de PC comprometió el desempeño productivo de cerdos en crecimiento. No se encontraron diferencias ($P > 0.10$) en GDP, CDA y CA en ningún periodo evaluado, entre los cerdos que consumieron la dieta AAL vs. AAL+NNE, lo cual indica que el NNE no es limitante para cerdos en esta etapa y alimentados a base de trigo. Los resultados de la expresión de $b^{0,+}$, y^+L y B^0 en duodeno, yeyuno e íleon se presentan en la tabla 4. La expresión de $b^{0,+}$ en duodeno fue mayor en los cerdos que recibieron la dieta con los AA en forma de proteína intacta ($P = 0.036$), pero no hubo diferencia en yeyuno e íleon. El transportador y^+L tendió a expresarse más en íleon de cerdos con la dieta AAL ($P = 0.098$) pero en duodeno y yeyuno no hubo diferencias. La expresión de B^0 no se afectó por la forma en que se incorporaron los AA en la dieta. Además, independientemente de la forma en que se

ofrecieron los AA en la dieta, la expresión de los tres transportadores fue mayor en yeyuno que en duodeno e íleon ($P < 0.00$). Este es el primer informe que muestra el efecto de la forma en que se incluyen los AA en la dieta sobre la expresión de los transportadores de AA catiónicos en intestino delgado. Se había especulado que la expresión de $b^{0,+}$ sería mayor en duodeno de cerdos con la dieta AAL.

Sin embargo, los resultados de este estudio indican que la presencia de proteína intacta tiene un mayor efecto en la expresión de $b^{0,+}$ que los AA libres. Por otra parte, estos datos muestran que la mayor absorción de AA ocurre en yeyuno, en coincidencia con reportes publicados previamente (Silk et al., 1985; Broer, 2008).

Tabla 1. Formulación (%) de Dietas Experimentales^a

Ingrediente, %	AAL	AAL+NNE	T-PS+AAL	T-PS
Trigo	91.46	90.45	81.73	65.00
Pasta de soya	4.00	4.00	13.80	30.27
L-Lys-HCl	0.80	0.80	0.50	
L-Thr	0.27	0.27	0.15	
DL-Met	0.11	0.11	0.07	
L-Trp	0.04	0.04		
L-Phe	0.09	0.09		
L-Leu	0.24	0.25		
L-Ile	0.13	0.14		
L-His	0.08	0.08		
L-Val	0.17	0.17	0.02	
Carbonato de calcio	1.40	1.40	1.28	1.25
Fosfato dicálcico	0.65	0.70	0.70	1.00
Sal iodada	0.35	0.35	0.35	0.35
Premezcal de vitaminas y minerales ^b	0.20	0.20	0.20	0.20
Glicina		1.00		
Aceite de Canola			1.20	2.00

^a Base tal como se ofrece

^b 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), 0.13mg.

Tabla 2. Primers utilizados para PCRq

mRNA	Primer	Localización (pb)	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
$b^{0,+}$ AT (SLC7A9)	Sentido	1-19	5'CGGAGAGAGGATGAGAAGT3'	562
	Antisentido	545-562	5'GCCCGCTGATGATGATGA3'	
y +L (SLC7A7)	Sentido	664	5'TCAAGTGGGGAACCCTGGTA3'	259
	Antisentido	922	5'ATGGAGAGGGGCAGATTCCT3'	
B0 (SLC 6A19)	Sentido	9	5'TCTGTCCACAACAACCTGCGAG3'	209
	Antisentido	218	5'CAGCGAAGTTCTCCTGCGTC3'	

Tabla 3. Efecto del nivel de proteína y la forma (libre vs. proteína intacta) en que los aminoácidos se incorporan a la dieta en el comportamiento de cerdos en crecimiento.

Variable ^b	Dieta				P= ^a		
	AAL	AAL+NNE	T-PS+AAL	T-PS	C ₁	C ₂	C ₃
GDP, kg/	0.716	0.721	0.721	0.709	0.917	0.913	0.887
CDA, kg/	1.451	1.448	1.515	1.381	0.981	0.648	0.613
C: G	2.039	2.022	2.104	1.968	0.914	0.662	0.638

^a C₁= AA + NNE vs AA libres, C₂= T-PS + AA vs AA libres, C₃= T-PS vs AAA libres

^b GDP = Ganancia Diaria de Peso, CDA = Consumo de Alimento y C: G = Consumo: Ganancia

Tabla 4. Expresión de b^{0,+}, y^{+L}, B⁰, en intestino delgado de cerdos alimentados con dietas conteniendo aminoácidos libres (AAL) o proteína intacta (AAP); unidades arbitrarias, relación mRNA:18s rRNA.

		AAL	AAP	EEM	P=
b ^{0,+}	Duodeno	0.007	0.014	0.002	0.036
	Yeyuno	0.018	0.025	0.003	0.118
	Íleon	0.012	0.010	0.002	0.480
y ^{+L}	Duodeno	0.018	0.016	0.003	0.600
	Yeyuno	0.033	0.029	0.003	0.435
	Íleon	0.025	0.016	0.003	0.098
B ⁰	Duodeno	0.010	0.012	0.002	0.541
	Yeyuno	0.057	0.037	0.010	0.199
	Íleon	0.017	0.015	0.003	0.631

CONCLUSIÓN

La reducción de hasta 8% en el nivel de PC en dietas base trigo y adicionada con AA libres no afecta la GDP, CDA y conversión alimenticia de cerdos en crecimiento, y puede reducir la excreción de nitrógeno fecal. Además, bajo estas condiciones el NNE no parece ser limitante para el desempeño productivo de cerdos en el rango de 25-50 kg. Por otra parte, la forma en que se incluyen los AA en la dieta (libre vs. proteína intacta) afecta la expresión de transportadores de AA catiónicos y esta es superior en yeyuno que en los otros dos segmentos intestinales.

REFERENCIAS

- Barrera, M.A., M. Cervantes, W.C. Sauer, A. Araiza, N. Torrentera, and M. Cervantes. 2004. Ileal amino acid digestibility and performance of growing pigs fed wheat-based diets supplemented with xylanase. *J. Anim. Sci.* 82:1997-2003
- Broer, A. 2008. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol. Rev.* 88: 249–286.
- Broer, A., K. Klingel, S. Kowalczyk, J.E. Rasko, J. Cavanaugh, S. Broer. 2004. Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J. Biol. Chem.* 279: 24467-24476.
- García-Villalobos, H., A. Morales-Trejo, B.A. Araiza-Piña, J.K. Htoo y 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. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97:263-270.
- Knowles, T. A., L. L. Southern, T. D. Bidner, B. J. Kerr, and K. G. Friesen. 1998. Effect of dietary fiber or fat in low-crude protein, crystalline amino acid-supplemented diets for finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 76:2818–2832.
- Le Bellego, L., 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.
- Morales, A., M.A. Barrera, B.A. Araiza, R.T. Zijlstra, H. Bernal, 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.
- Myer, R. O., J. H. Brendemuhl, y R. D. Barnett. 1996. Crystalline lysine and threonine supplementation of soft red winter wheat or triticale, low-protein diets for growing-finishing swine. *J. Anim. Sci.* 74:577-583
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ochoa MLI. ed. Diario Oficial de la Federación. México (DF), México.
- NRC (National Research Council). 1998. Nutrient requirements of swine. 11th ed. Washington (DC): National Academy Press.
- Palacin, M., E. Fernández, J. Chillaron, A. Zorzano. 2001. The amino acid transport system b^(0,+) and cystinuria. *Mol. Membr. Biol.* 18: 21-26.
- Silk, D.B., G.K. Grimble, R.G. Rees. 1985. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proc. Nutr. Soc.* 44:63-72.
- Yue, L. Y., 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. *Livestock Sci.* 115:144-152.