



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Desarrollo de un método para estimar las pérdidas
endógenas de proteína y aminoácidos a nivel ileal en
conejos en crecimiento

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Rodríguez Pont, Mireia

Tutor/a: Blas Ferrer, Enrique

Director/a Experimental: RODENAS MARTINEZ, LUIS

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

Desarrollo de un método para estimar las pérdidas endógenas de proteína y aminoácidos a nivel ileal en conejos en crecimiento.

TRABAJO FINAL DE MÁSTER EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

AUTORA: Mireia Rodríguez Pont

TUTOR: Enrique Blas Ferrer

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Luis Ródenas Martínez

CURSO ACADÉMICO: 2021-2022

VALENCIA, JUNIO 2022

Desarrollo de un método para estimar las pérdidas endógenas de proteína y aminoácidos a nivel ileal en conejos en crecimiento.

RESUMEN:

Estimar las necesidades nutritivas de los animales y el valor nutritivo de los alimentos de forma precisa siempre ha sido un reto clave de la nutrición animal, para reducir la cantidad de nutrientes no asimilados que acaban siendo excretados, lo que además de un sobrecoste supone una mayor contaminación ambiental.

En este sentido, la manera más precisa de valorar la cantidad de nitrógeno y aminoácidos que se absorben en el intestino delgado es la digestibilidad ileal, calculada como diferencia entre la ingestión y el flujo ileal. No obstante, parte del nitrógeno y los aminoácidos del flujo ileal no se aportan con la dieta, sino que proceden de las células epiteliales descamadas de la mucosa gastrointestinal, las mucinas y los enzimas digestivos. Conociendo el flujo de nitrógeno y aminoácidos endógenos se puede corregir la digestibilidad ileal aparente para obtener la digestibilidad ileal verdadera del nitrógeno y los aminoácidos aportados con la dieta. Este flujo de nitrógeno y aminoácidos endógenos ha sido estudiado en conejas adultas provistas de una cánula en T pero no se conoce para conejos en fase de crecimiento.

El objetivo de este trabajo es proponer un método para estimar las pérdidas endógenas de nitrógeno y aminoácidos a nivel ileal en conejos en crecimiento, sacrificados a los 64 días.

Para esto, se llevaron a cabo dos experimentos. El primero se llevó a cabo con 10 conejos destetados alimentados con un pienso con caseína como única fuente de proteína (cuya digestibilidad ileal es del 100%) y marcado con iterbio. Este experimento permitió obtener la relación entre el flujo de nitrógeno endógeno (FI_{NE}) y la ingestión de las últimas 24 horas (I), que se ajusta a la ecuación: FI_{NE} (mg/día) = $5.99 \times I$ (g MS/día) + 133. El segundo experimento se realizó con 36 conejos alimentados con la misma dieta pero sin iterbio, con cuyo contenido ileal se constituyeron 9 pools que permitieron calcular el perfil en aminoácidos del nitrógeno endógeno, que resultó ser rico en ácido glutámico, serina, ácido aspártico, glicina, valina y treonina, así como pobre en metionina e histidina.

Palabras clave: proteína, aminoácidos, pérdidas endógenas, digestibilidad ileal, conejo.

Mireia Rodríguez Pont

TUTOR: Enrique Blas Ferrer

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Luis Ródenas Martínez

CURSO ACADÉMICO: 2021-2022

Valencia, Junio 2022

Development of a method to estimate endogenous losses of protein and amino acids at the ileal level in growing rabbits.

ABSTRACT:

Estimating the nutritional requirements of animals and the nutritional value of feedstuffs accurately has always been a key challenge in animal nutrition, in order to reduce the amount of unassimilated nutrients that end up being excreted, which, in addition to being costly leads to increased environmental pollution.

In this regard, the most accurate way to assess the amount of nitrogen and amino acids absorbed in the small intestine is the ileal digestibility, calculated as the difference between intake and ileal flow. However, some nitrogen and amino acids in the ileal flow have not been supplied by the diet, but come from desquamated epithelial cells of gastrointestinal mucosa, mucins and digestive enzymes. By knowing the flow of endogenous nitrogen and amino acids, the apparent ileal digestibility can be corrected to give the true ileal digestibility of the nitrogen and amino acids provided by the diet. This flow of nitrogen and amino acids has been studied in adult rabbits fitted with a T-cannula but is not known for growing rabbits.

The aim of this thesis is to propose a method to estimate endogenous nitrogen and amino acid losses in the ileum of growing rabbits slaughtered at 64 days.

For this purpose, two experiments were carried out. The first was carried out with 10 weaned rabbits fed with a diet with casein as the only source of protein (whose ileal digestibility is 100%) and labelled with ytterbium. This experiment allowed to obtain the relationship between endogenous nitrogen flow (FI_{NE}) and the intake of the last 24 hours (I), which fits the equation: $FI_{NE} \text{ (mg/day)} = 5.99 \times I \text{ (g MS/day)} + 133$. The second experiment was carried out with 36 rabbits fed with the same diet but without ytterbium, with whose ileal content 9 pools were constituted to calculate the amino acid profile of endogenous nitrogen, which was found to be rich in glutamic acid, serine, aspartic acid, glycine, valine and threonine, and poor in methionine and histidine.

Keywords: protein, amino acids, endogenous losses, ileal digestibility, rabbit.

Mireia Rodríguez Pont

TUTOR: Enrique Blas Ferrer

EXPERIMENTAL DIRECTOR: Luis Ródenas Martínez

ACADEMIC YEAR: 2021-2022

Valencia, June 2022

A todas las personas que me apoyaron en el camino,

*En especial a mi madre, Julia, a mi hermana, Anna y a
Adrián por su confianza y paciencia,*

*A mis amigas y amigos por ser tan diferentes y
aportarme nuevas perspectivas,*

*También a mis tutores, Enrique y Luis por su dedicación,
por enseñarme a trabajar con esmero y por ser honestos
y cercanos,*

A Bruno que me ha hecho compañía mientras escribía,

Gracias, muchas gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	2
3.1.1. EXPERIMENTO 1	2
3.1.2. EXPERIMENTO 2	3
3.2. ANÁLISIS QUÍMICO.....	4
3.3. CÁLCULOS.....	5
4. RESULTADOS	7
4.1. RELACIÓN DEL FLUJO ILEAL DE NITRÓGENO ENDÓGENO CON LA INGESTIÓN.....	7
4.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DEL NITRÓGENO ENDÓGENO ILEAL	9
5. DISCUSIÓN.....	9
5. CONCLUSIÓN.....	12
6. BIBLIOGRAFÍA.....	12

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ingredientes (%) de la dieta a base de caseína del Experimento 1	3
Tabla 2. Composición (g/kg MS) de la dieta a base de caseína del Experimento 1	3
Tabla 3. Composición (g/kg MS) de la dieta a base de caseína del Experimento 2	4
Tabla 4. Ingestión (I), iterbio en el contenido ileal (Y_{b_i}), flujo ileal de materia seca (FI_{MS}), nitrógeno en el contenido ileal (N_i), flujo ileal de nitrógeno(FI_N), flujo ileal de nitrógeno ligado al residuo neutro-detergente (FI_{NRND}) y flujo ileal de nitrógeno endógeno (FI_{NE})	7
Tabla 5. Nitrógeno y perfil en aminoácidos del contenido ileal, del residuo neutro detergente y endógeno.	9
Tabla 6. Perfil en aminoácidos del nitrógeno endógeno ileal en conejos (g/16g N)	11

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regresión del flujo ileal de nitrógeno endógeno (FI_{NE}) sobre la ingestión.....	8
Figura 2. Relación del flujo ileal de nitrógeno endógeno con la ingestión en conejas adultas provistas de cánula en el íleon terminal (Villamide <i>et al.</i> 2013).....	10

1. INTRODUCCIÓN

Según la FAO, uno de los retos de la agricultura del siglo XXI es alimentar a una población cada vez mayor que podría llegar a 9.100 millones de personas en 2050. Este crecimiento se dará, principalmente, en los países en desarrollo y requerirá aumentar la producción de alimentos un 70%. En la mayoría de los países desarrollados la ingesta de proteína animal (en forma de carne, leche y huevos) supera los valores aconsejables, pero no sucede lo mismo en países menos favorecidos, donde la disponibilidad de alimentos de origen animal es aún insuficiente. En este marco, es interesante, entre otras cuestiones, mejorar la eficiencia con la que se alimentan los animales. Para ello, es fundamental estimar tanto las necesidades nutritivas de los animales como el valor nutritivo de los alimentos de la forma más precisa posible, con el fin de reducir la cantidad de nutrientes que no se asimilan y que acaban siendo excretados. Este exceso de nutrientes en la dieta supone, casi siempre, un sobrecoste e, ineludiblemente, mayor impacto ambiental.

En el caso de la nutrición proteica, los clásicos conceptos de proteína bruta (nitrógeno x 6.25) y aminoácidos totales han sido ampliamente superados por nuevos conceptos, cada vez más ajustados al proceso de digestión y absorción de estos nutrientes. Así, en comparación con la digestibilidad fecal, calculada por diferencia entre la ingestión y la excreción fecal, uno de los avances más importantes es el concepto de digestibilidad ileal, pensado para valorar las cantidades de nitrógeno y aminoácidos que se absorben en el intestino delgado (antes de que finalice el íleon), por diferencia entre la ingestión de tales nutrientes y su flujo a nivel del íleon terminal. Se asume que estas cantidades son la mejor estimación de las disponibles para el metabolismo del animal, ya que se elimina la interferencia de la microbiota del intestino grueso, que provoca que la excreción fecal de nitrógeno y aminoácidos sea sensiblemente distinta a su flujo ileal.

La digestibilidad ileal calculada como se ha indicado conduce a una subestimación del contenido de nitrógeno y aminoácidos de los alimentos, razón por la cual se conoce como digestibilidad ileal aparente. En efecto, una parte del nitrógeno y los aminoácidos de la digesta ileal no son de origen dietario, sino que son pérdidas endógenas, es decir, que provienen del propio tubo digestivo o de sus glándulas anejas, principalmente como constituyentes de las células epiteliales descamadas, las mucinas y los enzimas digestivos.

Estimar este componente endógeno del flujo ileal de nitrógeno y de los aminoácidos sirve para descontarlo de la digestibilidad ileal aparente y, de esta manera, conocer la digestibilidad ileal verdadera del nitrógeno y los aminoácidos que se aportan con la dieta. Para estudiarlo, los animales se alimentan con dietas libres de nitrógeno o con dietas cuyo contenido en nitrógeno está exclusivamente en forma de proteína completamente digestible en el intestino delgado (como la caseína). Sobre esto, García *et al.* (2004) señalan que el uso de dietas libres de nitrógeno es poco aconsejable porque dan lugar a una ingestión de materia seca anómalamente baja y recomiendan el uso de dietas a base de caseína.

En ambos tipos de dieta se puede asumir que todo el nitrógeno y los aminoácidos presentes en el contenido del íleon terminal son, a priori, necesariamente endógenos, si bien debe tenerse en cuenta la posibilidad de que una pequeña parte del nitrógeno y los aminoácidos del

contenido del íleon terminal sean de origen dietario y, en su caso, hacer la corrección oportuna.

En el caso del conejo, este componente endógeno se ha estudiado hasta ahora con un modelo animal de conejas adultas provistas de una cánula en T colocada quirúrgicamente en el íleon terminal (García *et al.*, 2004 y 2005; Villamide *et al.*, 2013) pero no se conoce para conejos en fase de crecimiento.

Este modelo con animales provistos de una cánula en T no es aplicable a conejos en crecimiento (de 4 a 9 semanas de vida), esencialmente por la dificultad de implantar estas cánulas en gazapos recién destetados y porque la recuperación postquirúrgica completa sólo se conseguiría cuando los animales tuvieran una edad poco representativa de la que tiene la población de conejos en crecimiento.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo consiste en desarrollar un método para conocer las pérdidas endógenas de proteína y aminoácidos a nivel ileal en conejos en crecimiento y así poder determinar la digestibilidad ileal verdadera de la proteína y los aminoácidos que se aportan con la dieta, basado en el empleo de una dieta a base de caseína.

Para ello, el trabajo aborda dos objetivos específicos:

- i) Obtener una ecuación de regresión que permita relacionar el flujo ileal de nitrógeno endógeno con la ingestión de materia seca.
- ii) Determinar el perfil de aminoácidos del nitrógeno endógeno.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron dos experimentos, uno para cada uno de los objetivos concretos que se han mencionado previamente. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo según el *Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia*, siendo aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la Universitat Politècnica de València y autorizados por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural de la Generalitat Valenciana (2018/VSC/PEA/0116).

3.1.1. EXPERIMENTO 1

Se utilizaron 10 gazapos destetados de 28 días (772 ± 34 g de peso vivo), pertenecientes a 5 camadas distintas de la línea R (línea paternal de la Universidad Politécnica de Valencia, seleccionada por ganancia media diaria durante el cebo), que se alojaron en jaulas individuales y dispusieron *ad libitum* tanto de agua como de una dieta a base de caseína, a la que se añadió

un 0.8% de heno de alfalfa marcado con iterbio según García *et al.* (1999). Los ingredientes y composición de la dieta utilizada se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Ingredientes (%) de la dieta a base de caseína del Experimento 1

Caseína ¹	16.0
Almidón de maíz ²	28.0
Pectina de cítricos ³	10.0
Paja de trigo	24.0
Concentrado fibroso ⁴	16.0
Aceite de soja	1.8
Carbonato cálcico	0.5
Fosfato bicálcico	2.5
Cloruro sódico	0.5
Bicarbonato sódico	0.2
Corrector de vitaminas y oligolementos ⁵	0.5

¹ Armor proteins, Saint Brice en Cogles, Francia

² Tereos Starch and Sweeteners Iberia, Zaragoza

³ Classic CU 201, Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg, Alemania

⁴ Arbocel®, Rettenmaier Ibérica, Barcelona

⁵ L-511, Trouw Nutrition España, Tres Cantos: aporta, por kg de pienso, Vitamina A: 12000 UI, Vitamina D3: 1080 UI, Vitamina E: 45 UI, Vitamina K3: 1.2 mg, Vitamina B1: 2 mg, Vitamina B2: 6 mg, Vitamina B6: 2 mg, Vitamina B12: 10 µg, Niacinamida: 40 mg, Pantotenato cálcico: 20 mg, Ácido pantoténico: 18.4 mg, Ácido fólico: 5 mg, Biotina: 75 µg, Cloruro de colina: 260 mg, Manganeso: 20 mg, Zinc: 75 mg, Cobre: 14 mg, Yodo: 1.1 mg, Cobalto: 0.49 mg, Selenio: 0.06 mg, Hierro: 78 mg, Robenidina: 60 mg

Tabla 2. Composición (g/kg MS) de la dieta a base de caseína del Experimento 1

Materia seca (g/kg)	921
Proteína bruta (nitrógeno × 6.25)	148
Residuo neutro-detergente	336
Nitrógeno ligado a fibra (g/kg residuo neutro-detergente)	5.41
Iterbio (mg/kg MS)	5.07

Se controló el consumo de pienso semanalmente hasta los 63 días, así como en las 24 horas previas al sacrificio, que se realizó a los 64 días para recoger muestras del contenido del íleon terminal (30 cm antes de la válvula ileo-ceco-cólica), a partir de las 20:00 h., para minimizar la influencia de la cecotrofia en la composición de dicho contenido (Merino y Carabaño, 2003). Las muestras de contenido ileal se dispusieron en placas Petri y se almacenaron a -20 °C, hasta ser liofilizadas y molidas para su análisis. Con los excedentes de las 10 muestras de contenido ileal se constituyó un único pool.

3.1.2. EXPERIMENTO 2

Se utilizaron 5 camadas de 8 gazapos cada una, pertenecientes a la línea R antes mencionada. Desde el destete (28 días), los animales se alojaron en jaulas colectivas y dispusieron *ad libitum* tanto de agua como de un pienso comercial de cebo (Cunivita SD, Nanta, Meliana), hasta los 49 días, momento en el que pasaron a recibir una dieta a base de caseína como la descrita en la Tabla 1, aunque en este caso la pectina de cítricos utilizada fue distinta (CEAMPECTIN SS

4510, Ceamsa, Porriño) y no se añadió heno de alfalfa marcado con iterbio. Su composición se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición (g/kg MS) de la dieta a base de caseína del Experimento 2

Materia seca (g/kg)	920
Proteína bruta (nitrógeno × 6.25)	156
Residuo neutro-detergente	305
Nitrógeno ligado a fibra (g/kg residuo neutro-detergente)	5.16
Aminoácidos esenciales	
Arginina	5.26
Cisteína	0.67
Fenilalanina	7.38
Histidina	3.93
Isoleucina	7.11
Leucina	14.1
Lisina	10.1
Metionina	4.26
Treonina	4.68
Valina	9.56
Aminoácidos no esenciales	
Ácido aspártico	9.34
Ácido glutámico	30.7
Alanina	4.19
Glicina	3.32
Prolina	15.2
Serina	7.31
Tirosina	4.48

Durante el cebo murieron 4 animales y los restantes 36 se sacrificaron a los 64 días para recoger muestras del contenido del íleon terminal (30 cm antes de la válvula ileo-ceco-cólica), a partir de las 20:00 h., para minimizar la influencia de la cecotrofia en la composición de dicho contenido (Merino y Carabaño, 2003). Las muestras de contenido ileal se dispusieron en placas Petri y se almacenaron a -20 °C, hasta ser liofilizadas, tras lo cual se constituyeron 9 pools acumulando el contenido ileal de 4 animales en cada uno, que se molieron para su análisis.

3.2. ANÁLISIS QUÍMICO

Las dietas a base de caseína (2) y el contenido ileal (10 muestras individuales en el Experimento 1 y 9 pools en el Experimento 2) se analizaron siguiendo los procedimientos de la AOAC (2002) para materia seca (934.01) y para nitrógeno (990.03, método Dumas o de combustión).

También se analizó su contenido en aminoácidos, tras hidrólisis ácida con HCL 6N a 110 °C durante 23 h. Se siguió la metodología descrita por Bosch *et al.* (2006) y Alagón *et al.* (2016), utilizando un sistema HPLC Waters (Milford, Massachusetts, EEUU) que consta de dos bombas, un muestreador automático, un detector de fluorescencia y un módulo de control de temperatura. Se añadió ácido aminobutírico como patrón interno después de la hidrólisis. Los

aminoácidos se derivatizaron con AQC (carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo) y se separaron con una columna de fase inversa C-18 Waters AcQ Tag (150 mm × 3.9 mm). La metionina y la cistina se determinaron por separado como metionina sulfona y ácido cisteico respectivamente, después de oxidación con ácido per fórmico seguida de hidrólisis ácida.

Asimismo, las dietas a base de caseína y el contenido ileal (sólo un pool en el Experimento 1 y 9 pooles en el Experimento 2) se sometieron a una extracción con detergente neutro según Mertens *et al.* (2002). En los residuos neutro-detergentes resultantes se analizaron la materia seca, el nitrógeno y los aminoácidos, siguiendo la metodología indicada anteriormente.

En el Experimento 1, el iterbio de la dieta a base de caseína y del contenido ileal (10 muestras individuales) se analizó según García *et al.* (1999), mediante espectrometría de absorción atómica (Smith-Hieftje 22, Thermo Jarrell Ash, Massachusetts, EEUU), con muestras previamente incineradas (550°C) y digeridas por ebullición con una solución de HNO₃ 1.5 M y KCl 0.05 M.

3.3. CÁLCULOS

En el Experimento 1, se calculó el flujo ileal de materia seca (FI_{MS} , g/día) mediante la técnica de la dilución del marcador (iterbio), según la siguiente ecuación:

$$FI_{MS} = \left(\frac{I \times Yb_d}{Yb_i} \right)$$

donde:

I = ingestión en las 24 h previas al sacrificio (g MS/día)

Yb_d = iterbio en la dieta (mg/kg MS)

Yb_i = iterbio en el contenido ileal (mg/kg MS)

El flujo de nitrógeno (FI_N , mg/día) se obtuvo con la expresión:

$$FI_N = FI_{MS} \times N_i$$

donde:

N_i = nitrógeno en el contenido ileal (g/kg MS)

Asimismo, se calculó el flujo ileal de nitrógeno ligado al residuo neutro-detergente (FI_{NRND} , mg/día), como la mejor estimación posible del nitrógeno de origen dietario (no endógeno) que alcanza el íleon terminal, aportado fundamentalmente por la paja de cereal y el concentrado fibroso, mediante la expresión:

$$FI_{NRND} = \frac{FI_{MS} \times RND_i \times N_{RNDi}}{1000}$$

donde:

RND_i = residuo neutro-detergente del único pool de contenido ileal (g/kg MS)

N_{RND_i} = nitrógeno en el residuo neutro-detergente del único pool de contenido ileal (g/kg MS)

En consecuencia, el flujo ileal de nitrógeno endógeno (FI_{NE} , mg/día) se obtuvo por diferencia entre FI_N y FI_{NRDN} . Se realizó un análisis de regresión lineal del FI_{NE} sobre la ingestión de materia seca en las últimas 24 horas.

En el Experimento 2, se calculó el nitrógeno endógeno del contenido ileal (NE, g/kg MS), mediante la expresión:

$$NE = N_i - RND_i \times N_{RND_i}$$

donde:

N_i = nitrógeno en el contenido ileal (g/kg MS)

RND_i = residuo neutro-detergente del pool de contenido ileal (g/g MS)

N_{RND_i} = nitrógeno en el residuo neutro-detergente del pool de contenido ileal (g/kg MS)

También se obtuvo el perfil en aminoácidos de la proteína endógena (AAE, g/kg MS) de acuerdo con la siguiente expresión:

$$AAE = AA_i - RND_i \times AA_{RND_i}$$

Donde:

AA_i = aminoácido en el contenido ileal (g/kg MS)

RND_i = residuo neutro-detergente del pool de contenido ileal (g/g MS)

AA_{RND_i} = aminoácido en el residuo neutro-detergente del pool de contenido ileal (g/kg MS)

Finalmente, se obtuvo el contenido de cada aminoácido como g/16 g de NE.

4. RESULTADOS

4.1. RELACIÓN DEL FLUJO ILEAL DE NITRÓGENO ENDÓGENO CON LA INGESTIÓN

La Tabla 4 muestra todos los datos obtenidos en el Experimento 1, utilizados para calcular el flujo ileal de nitrógeno endógeno.

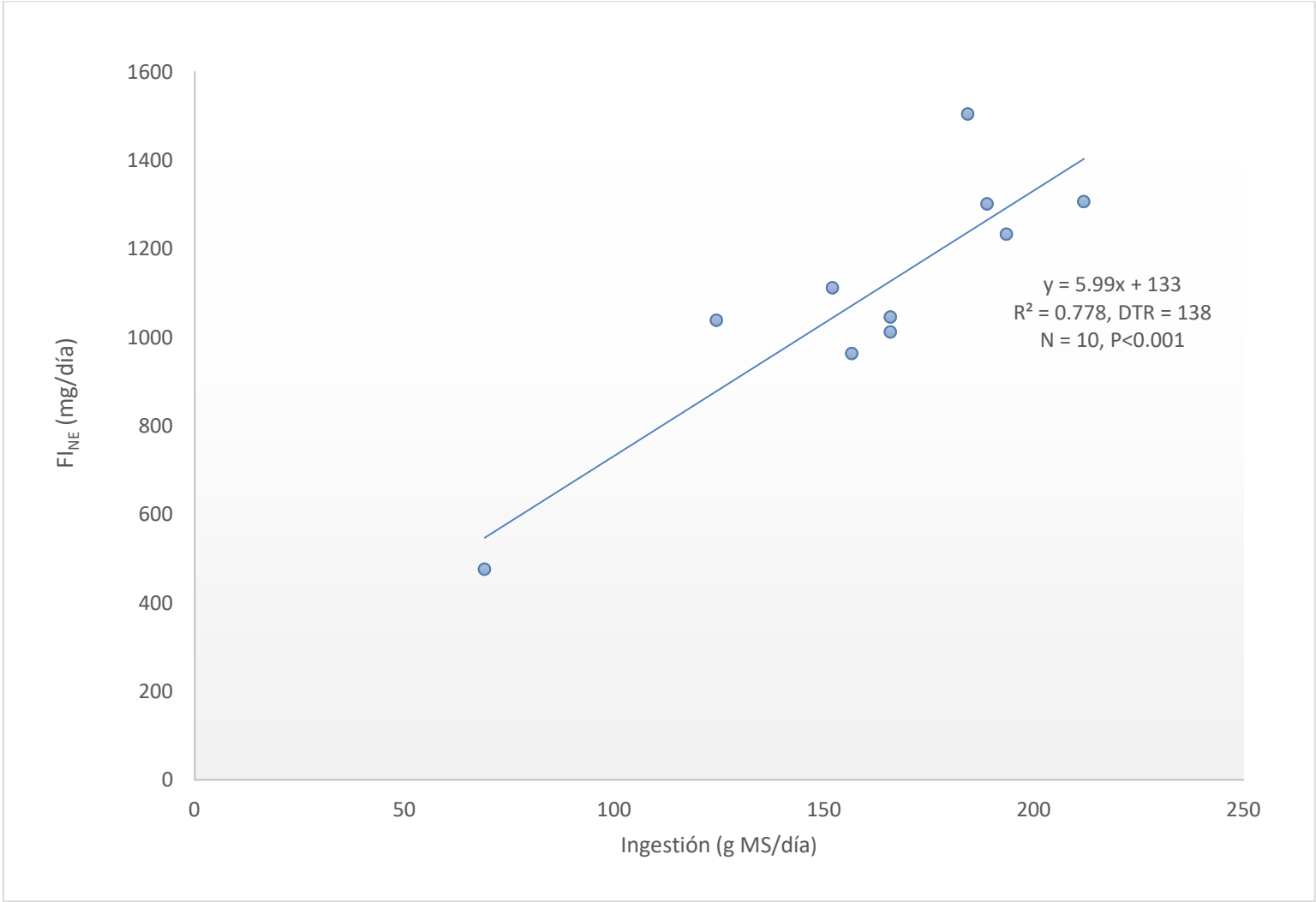
Tabla 4. Ingestión (I), iterbio en el contenido ileal (Y_{b_i}), flujo ileal de materia seca (FI_{MS}), nitrógeno en el contenido ileal (N_i), flujo ileal de nitrógeno (FI_N), flujo ileal de nitrógeno ligado al residuo neutro-detergente (FI_{NRND}) y flujo ileal de nitrógeno endógeno (FI_{NE}).

Conejo	I (g MS/día)	Y_{b_i} (mg/kg MS)	FI_{MS} (g/día)	N_i (g/kg MS)	FI_N (mg/día)	FI_{NRND} (mg/día)	FI_{NE} (mg/día)
1	152.0	7.59	101.6	12.9	1308	195	1112
2	193.5	7.89	124.3	11.8	1473	239	1234
3	211.9	8.13	132.2	11.8	1561	254	1307
4	184.3	9.34	100.1	17.0	1698	193	1505
5	69.1	8.83	39.7	13.9	553	76	476
6	156.6	8.51	93.4	12.2	1143	180	964
7	165.9	10.50	80.1	14.6	1167	154	1012
8	124.4	7.25	87.0	13.9	1206	167	1039
9	188.9	8.15	117.5	13.0	1528	226	1302
10	165.9	8.02	104.9	11.9	1248	202	1046

Yterbio en la dieta = 5,07 (mg/kg MS), residuo neutro-detergente del pool de contenido ileal = 526 g/kg MS, nitrógeno en el residuo neutro-detergente del pool de contenido ileal= 3.66 g/kg MS

Con la ingestión y el flujo ileal de nitrógeno endógeno se obtuvo la recta de regresión mostrada en la Figura 1.

Figura 1. Regresión del flujo ileal de nitrógeno endógeno (FI_{NE}) sobre la ingestión



4.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DEL NITRÓGENO ENDÓGENO ILEAL

En la Tabla 5 se muestra los resultados del Experimento 2, es decir, el contenido en nitrógeno del flujo ileal y su perfil en aminoácidos.

Tabla 5. Nitrógeno y perfil en aminoácidos del contenido ileal, del residuo neutro detergente y endógeno.

	Contenido ileal (g/kg MS)	Residuo neutro detergente (g/kg MS)	Endógeno	
			g/kg MS	g/16g de N
NITRÓGENO	11.308 ± 0.89	4.018 ± 0.24	9.383 ± 0.93	-
AMINOÁCIDOS ESENCIALES				
ARGININA	1.47 ± 0.20	0.19 ± 0.07	1.38 ± 0.20	2.53 ± 0.38
CISTEÍNA	1.01 ± 0.08	0.18 ± 0.03	0.93 ± 0.07	1.72 ± 0.23
FENILALANINA	1.41 ± 0.09	0.34 ± 0.01	1.25 ± 0.09	2.29 ± 0.22
HISTIDINA	0.76 ± 0.07	0.05 ± 0.03	0.74 ± 0.07	1.34 ± 0.16
ISOLEUCINA	2.94 ± 0.17	0.39 ± 0.01	2.76 ± 0.18	4.97 ± 0.49
LEUCINA	2.90 ± 0.20	0.63 ± 0.01	2.60 ± 0.20	4.72 ± 0.46
LISINA	1.85 ± 0.14	0.37 ± 0.01	1.68 ± 0.14	3.04 ± 0.26
METIONINA	0.68 ± 0.07	0.18 ± 0.03	0.59 ± 0.07	1.05 ± 0.06
TREONINA	2.98 ± 0.17	0.44 ± 0.02	2.77 ± 0.17	4.97 ± 0.47
VALINA	3.32 ± 0.20	0.60 ± 0.02	3.03 ± 0.20	5.48 ± 0.51
AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES				
ÁCIDO ASPÁRTICO	4.27 ± 0.32	0.75 ± 0.02	3.91 ± 0.33	7.06 ± 0.72
ÁCIDO GLUTÁMICO	9.46 ± 0.50	1.22 ± 0.07	8.88 ± 0.52	15.97 ± 1.33
ALANINA	2.67 ± 0.19	0.77 ± 0.03	2.30 ± 0.19	4.15 ± 0.41
GLICINA	3.61 ± 0.25	0.56 ± 0.04	3.34 ± 0.26	6.24 ± 0.77
PROLINA	2.90 ± 0.15	0.71 ± 0.02	2.56 ± 0.15	4.64 ± 0.44
SERINA	4.76 ± 0.30	0.58 ± 0.03	4.49 ± 0.31	8.00 ± 0.80
TIROSINA	0.80 ± 0.08	0.14 ± 0.02	0.73 ± 0.08	1.35 ± 0.11

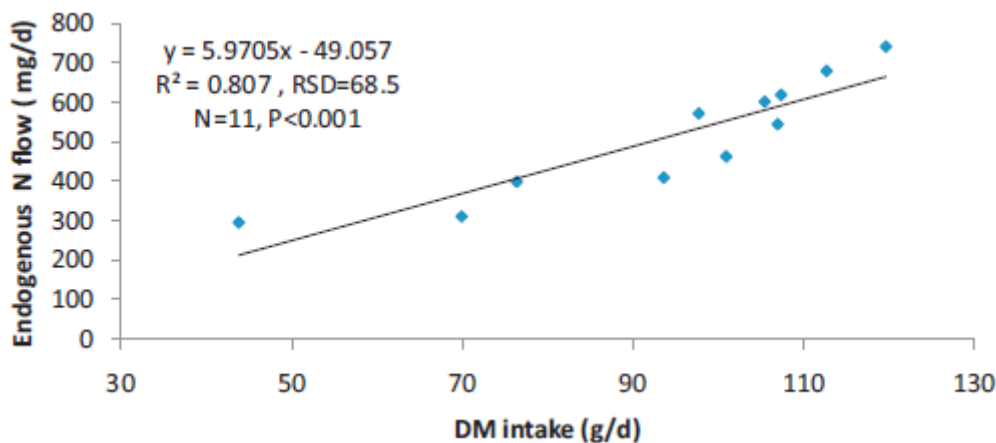
Residuo neutro detergente = 476 ± 12 g/kg MS (media ± error estándar)

5. DISCUSIÓN

La recta de regresión del flujo ileal de nitrógeno endógeno sobre la ingestión de materia seca es muy similar a la obtenida por Villamide *et al.* (2013) en conejas adultas provistas de cánulas en T en el íleon terminal, cuyas muestras se recogieron entre las 19 y 23 horas, como puede verse en la Figura 2. En ambos casos, el flujo ileal de nitrógeno endógeno aumenta aproximadamente en 6 mg por cada g que aumenta la ingestión de materia seca, aunque la ingestión media fue un 71% superior en el presente estudio (161 g/día vs. 94.0 g/día). Estas diferencias en la ingestión se deberían a que las conejas eran adultas en mantenimiento, con necesidades menores que los conejos del presente experimento que se encontraban en pleno crecimiento.

Por otro lado, el flujo ileal de nitrógeno endógeno en ayuno puede estimarse en 133 mg/día y correspondería a las pérdidas endógenas mínimas, en situación basal.

Figura 2. Relación del flujo ileal de nitrógeno endógeno con la ingestión en conejas adultas provistas de cánula en el íleon terminal (Villamide *et al.* 2013).



En la Tabla 6 se comparan los perfiles en aminoácidos del nitrógeno endógeno ileal del presente trabajo y los recogidos en la bibliografía. Independientemente de las diferencias metodológicas (modelo animal: conejas adultas o conejos en crecimiento; tipo de dieta: con caseína o libre de nitrógeno; cecotrofia: permitida o no permitida; hora de colecta del contenido ileal: mañana y tarde o tarde-noche), el total de los aminoácidos endógenos representa, en general, el 75-80% del NE x 6.25. Para explicar este hecho, debe tenerse en cuenta que:

- i) Como es habitual, no se incluye el contenido en triptófano, cuyo análisis no está bien resuelto.
- ii) El factor 6.25 se utiliza porque se asume que todas las proteínas contienen 160 g de N/kg, cuando en realidad este valor es variable y habría que usar un factor distinto para cada proteína (McDonald *et al.* 1999).
- iii) Se asume que todo el nitrógeno endógeno es proteico, cuando parte de ese nitrógeno está formando parte de compuestos no proteicos como por ejemplo ácidos nucleicos (McDonald *et al.* 1999).

En general, el perfil de los aminoácidos endógenos del contenido ileal es bastante similar entre los diferentes trabajos. Si comparamos directamente los resultados del presente trabajo con los de Villamide *et al.* (2013) y García *et al.* (2004) en dietas con caseína y evitando la interferencia de la cecotrofia, por ser los obtenidos con una metodología similar, se observa que los aminoácidos más abundantes son ácido glutámico, serina, ácido aspártico, glicina, valina y treonina, mientras que los más escasos son metionina e histidina. Las principales diferencias entre los resultados del presente trabajo con los de Villamide *et al.* (2013) son un mayor contenido en glutámico y serina, y menor contenido en tirosina, fenilalanina y glicina, mientras que si se compara con los de García *et al.* (2004) se observa un mayor contenido en ácido glutámico y menor contenido en arginina y cisteína.

De forma análoga, Blok *et al.* (2017) y Adeola *et al.* (2016) señalan que la proteína endógena ileal en pollos es rica en ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, treonina, serina y prolina, así como pobre en metionina e histidina, lo que refleja con bastante aproximación la composición de las mucoproteínas. Asimismo, Stein *et al.* (1999) apuntan que la proteína endógena en el íleon de cerdos en crecimiento es rica en prolina, ácido glutámico, ácido aspártico y glicina, así como pobre en metionina e histidina.

Tabla 6. Perfil en aminoácidos del nitrógeno endógeno ileal en conejos (g/16g N)

Referencia	García <i>et al.</i> (2004)				Villamide <i>et al.</i> (2013)	Presente trabajo
Modelo animal	Conejas adultas canuladas				Conejas adultas canuladas	Conejos crecimiento
Dieta	Caseína		N-free		Caseína	Caseína
Cecotrofia	permitida	no permitida	permitida	no permitida	permitida	permitida
Horas de colecta de contenido ileal	11:00 20:00	11:00 20:00	11:00 20:00	11:00 20:00	19:00-23:00	20:00-24:00
AA ESENCIALES						
Arginina	4.63	4.08	4.31	4.85	3.63	2.53
Cisteína	3.11	3.14	2.92	3.45	2.75	1.72
Fenilalanina	2.09	1.67	1.97	2.16	4.13	2.29
Histidina	1.53	1.58	1.42	1.65	1.29	1.34
Isoleucina	3.72	3.73	2.70	2.87	3.81	4.97
Leucina	4.77	4.45	3.92	4.57	4.31	4.72
Lisina	3.76	3.23	3.72	3.07	3.56	3.04
Metionina	0.96	0.87	0.98	0.87	0.81	1.05
Treonina	5.53	4.93	4.70	5.68	5.56	4.97
Valina	5.64	5.29	4.83	5.48	5.06	5.48
AA NO ESENCIALES						
Ácido aspártico	7.53	6.97	6.85	7.56	7.22	7.06
Ácido glutámico	12.66	12.57	8.60	8.61	12.47	15.97
Alanina	3.56	3.05	3.71	3.33	3.38	4.15
Glicina	5.18	6.05	5.65	10.51	8.00	6.24
Prolina	5.41	4.83	3.38	4.91	4.66	4.64
Serina	6.45	6.59	4.38	4.47	5.75	8.00
Tirosina	2.07	1.73	2.02	2.00	3.47	1.35
TOTAL	78.6	74.8	66.1	76.0	79.8	79.5

5. CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo permiten proponer un método para estimar las pérdidas endógenas de proteína y aminoácidos a nivel ileal en conejos en crecimiento y, en consecuencia, poder transformar la digestibilidad ileal aparente en digestibilidad ileal verdadera. El procedimiento a seguir incluye:

- a) Utilizar la ecuación obtenida para estimar el flujo ileal de nitrógeno endógeno (FI_{NE}) a partir de la ingestión en las últimas 24 horas antes del sacrificio (I): $FI_{NE} \text{ (mg/día)} = 5.99 \times I \text{ (g MS/día)} + 133$
- b) Estimar el flujo ileal de cada aminoácido endógeno conforme al perfil en aminoácidos del nitrógeno endógeno que se presenta en los resultados de este trabajo.

6. BIBLIOGRAFÍA

ADEOLA O., XUE P.C., COWIESON A.J., AJUWON K.M. (2016). Basal endogenous losses of amino acids in protein nutrition research for swine and poultry. *Animal Feed Science and Technology* 221, 274-283.

ALAGÓN G., ARCE O.N., MARTÍNEZ-PAREDES E.M., RÓDENAS L., MOYA V.J., BLAS E., CERVERA C., PASCUAL J.J. (2016). Nutritive value of distillers dried grains with solubles from barley, corn and wheat for growing rabbits. *Animal Feed Science and Technology* 222, 217-226.

AOAC. (2002). *Official Methods of Analysis*. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

BLOK M.C., JANSMA A.J.M., MAKKINK C.A. (2017). Amount and amino acid composition of basal endogenous protein losses at the terminal ileum of broilers. *CVB documentation report nr. 60*. Wageningen Livestock Research.

BOSCH L., ALEGRÍA A., FARRÉ R. (2006). Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. *Journal of Chromatography* 831, 176-183.

GARCÍA J., CARABAÑO R., DE BLAS J.C. (1999). Effect of fiber source on cell wall digestibility and rate of passage in rabbits. *Journal of Animal Science* 77, 898-905.

GARCÍA A.I., DE BLAS J.C., CARABAÑO R. (2004). Effect of type of diet (casein-based or protein-free) and caecotrophy on ileal endogenous nitrogen and amino acid flow in rabbits. *Animal Science* 79, 231-240.

GARCIA A.I., DE BLAS J.C., CARABAÑO R. (2005). Comparison of different methods for nitrogen and amino acid evaluation in rabbit diets. *Animal Science* 80, 169-178.

MCDONALD P., EDWARDS R.A., GREENHALGH J.F.D., MORGAN, C.A. (1999). *Nutrición Animal*, 5ª ed. Acribia, Zaragoza.

MERINO J.M., CARABAÑO R. (2003). Efecto de la cecotrofia sobre la composición química de la digesta y sobre la digestibilidad ileal. *ITEA* 24, 657-659.

MERTENS D.R., ALLEN M., CARMANY J., CLEGG J., DAVIDOWICZ A., DROUCHES M., FRANK K., GAMBIN D., GARKIE M., GILDEMEISTER B., JEFFRESS D., JEON C.S., JONES D., KAPLAN D., KIM G.N., KOBATA S., MAIN D., MOUA X., PAUL B., ROBERTSON J., TAYSOM D., THIEX N., WILLIAMS J., WOLF M. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC international* 85, 1217-1240.

STEIN H.H., TROTTIER N.L., BELLAVER C., EASTER R.A. (1999). The effect of feeding level and physiological status on total flow and amino acid composition of endogenous protein at the distal ileum in swine. *Journal of Animal Science* 77, 1180-1187.

VILLAMIDE M.J., GARCIA A.I., LLORENTE A., CARABAÑO R. (2013) Ileal vs. faecal amino acid digestibility in concentrates and fibrous sources for rabbit feed formulation. *Animal Feed Science and Technology* 182, 100-110.