



**Universidad Autónoma de Querétaro**

**Facultad de Ciencias Naturales**

**Identificación de proteínas antigénicas de pasta de soya y su digestión en  
lechones recién destetados**

**Tesis**

**Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de**

**Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable**

**Presenta**

**MVZ. María Alondra Moreno Vázquez**

**Dirigido por:**

**Dra. Araceli Aguilera Barreyro**

**Co-Director:**

**Dra. Elba Rodríguez Hernández**

**Querétaro, Qro., Diciembre 2018**



**Universidad Autónoma de Querétaro**

**Facultad de Ciencias Naturales**

**Maestría en salud y producción animal sustentable**

**Identificación de proteínas antigénicas de pasta de soya y su digestión en  
lechones recién destetados**

**Tesis**

**Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de**

**Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable**

**Presenta**

**MVZ. María Alondra Moreno Vázquez**

**Dirigido por:**

**Dra. Araceli Aguilera Barreyro**

**Co-dirigido por:**

**Dra. Elba Rodríguez Hernández**

**Dra. Araceli Aguilera Barreyro**  
Presidente

**Dra. Elba Rodríguez Hernández**  
Secretario

**Dr. José Guadalupe Gómez Soto**  
Vocal

**Dra. Tercia Cesária Reis de Souza**  
Vocal

**Dr. Gerardo Mariscal Landín**  
Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Diciembre 2018  
México

## RESUMEN

En este estudio se identificaron las proteínas antigénicas (PA) de pastas de soya (PS) y se evaluó su digestión en lechones recién destetados (LRD) en 3 experimentos. 1: Se evaluaron 14 PS de tres empresas de alimentos, para caracterizar, identificar y cuantificar las PA ( $\beta$ -conglucina 7S y glicina 11S) mediante su *pI*. Las fracciones 7S y 11S se separaron mediante electroforesis-SDS-PAGE. La masa-molecular de las subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  de la fracción 7S fueron 78.4, 72.1, 49.9 kDa; y de las cadenas ácidas y básicas de la fracción (11S), fueron 42.2, 37.3 y 24.0 kDa. La densidad específica de proteínas (DEP) de las subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  (7S) fue de 2427, 2044 y 7482 INTxmm<sup>2</sup>/μg de proteína, respectivamente; y para las cadenas ácidas y básicas (11S) fue de 6714, 11969 y 17432 INTxmm<sup>2</sup>/μg de proteína, respectivamente. La fracción 11S mostró mayor DEP, que la fracción 7S presentando diferencias entre las PS y la empresa de origen. 2: Se evaluaron muestras de estómago, yeyuno e íleon de LRD alimentados con PS (20%) colectados a 3 y 12 horas postconsumo (HPC) para identificar, cuantificar y evaluar la digestión de las PS mediante SDS-PAGE-2DE y Wester-blot-2DE. No se encontraron diferencias en relación a la concentración de proteína en las digestas colectadas a 3 y 12 HPC. En los lechones consumiendo PS se observó en la fracción 7S, que la subunidad  $\alpha'$  fue digerida en el estómago y en intestino delgado (ID), mientras que las  $\alpha$  y  $\beta$  fueron estables a la digestión a lo largo del tracto gastrointestinal (TG); de la fracción 11S las subunidades ácidas fueron digeridas en el estómago y en el ID; mientras que las básicas fueron estables a la digestión a lo largo del TG. 3: Se evaluaron muestras de contenidos ileales de LRD alimentados con cuatro dietas a base de PS en diferentes niveles de inclusión, procesándolas mediante SDS-PAGE-2DE y *Western-blot*-2DE para la identificación, cuantificación y evaluación de la digestión de la PS. En general hubo una alta concentración de las fracciones 7S y 11S en el íleon sin presentar diferencias entre los niveles de PS. Los resultados obtenidos son un aporte al conocimiento acerca de la caracterización de las proteínas antigénicas de la PS y de su comportamiento en la digestión en lechones alimentados con PS.

Palabras clave: Destete, pasta de soya, proteínas antigénicas,  $\beta$ -conglucina (7S), glicina (11S), digestión

## SUMMARY

In this study the antigenic proteins (AP) of soybean meal (SM) were identified and their digestion in newly weaned piglets (NWP) was evaluated in 3 experiments. 1: 14 SM from three food companies were evaluated to characterize, identify and quantify the AP ( $\beta$ -conglycinin 7S and glycinin 11S) by means of their *pI*. Fractions 7S and 11S were separated by electrophoresis-SDS-PAGE. The molecular mass of the  $\alpha'$ ,  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the 7S fraction were 78.4, 72.1, 49.9 kDa; and of the acidic and basic chains of fraction (11S), were 42.2, 37.3 and 24.0 kDa. The specific protein density (SPD) of the  $\alpha'$ ,  $\alpha$  and  $\beta$  (7S) subunits was 2427, 2044 and 7482 INTxmm<sup>2</sup>/μg of protein, respectively; and for acidic and basic chains (11S) it was 6714, 11969 and 17432 INTxmm<sup>2</sup>/μg of protein, respectively. The 11S fraction showed higher SPD, than the 7S fraction showing differences between the SM and the company of origin. 2: Stomach, jejunum and ileum samples of NWP fed with SM (20%) collected at 3 and 12 hours post-consumption (HPC) were evaluated to identify, quantify and evaluate the digestion of SM by SDS-PAGE-2DE and *Western-blot*-2DE. No differences were found in relation to the concentration of protein in the digests collected at 3 and 12 HPC. In piglets consuming SM was observed in fraction 7S, that the  $\alpha'$  subunit was digested in the stomach and small intestine (SI), while  $\alpha$  and  $\beta$  were stable to digestion along the gastrointestinal tract (GT); of the 11S fraction the acid subunits were digested in the stomach and in the SI; while the basic ones were stable to digestion along the GT. 3: samples of ileal contents of RWP fed with four diets based on SM at different levels of inclusion were evaluated, processing them by SDS-PAGE-2DE and *Western-blot*-2DE for the identification, quantification and evaluation of SM digestion. In general there was a high concentration of fractions 7S and 11S in the ileum without differences between SM levels. The results obtained are a contribution to the knowledge about

the characterization of the antigenic protein of the SM and their behavior in the digestion in piglets fed with SM.

Keywords: Weaning, soybean meal, antigenic proteins,  $\beta$ -conglycinin, glycinin, digestion.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## DEDICATORIAS

A mi hijo Elías, por ser la razón más poderosa e importante para seguir adelante.

A Eduardo y a mis padres, Elena y Gerardo, por brindarme su amor, su apoyo y su confianza incondicional siempre.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, principalmente a la Facultad de Ciencias Naturales y a la Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable, por darme la oportunidad de aprender y formarme como profesionista.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para realizar mis estudios de posgrado.

Agradezco a la Secretaria de Educación Pública (SEP) por el financiamiento del Proyecto de la Red temática de colaboración “Nutrición, alimentación y salud”, convocatoria 2015.

A mi directora de tesis, la Dra. Araceli Aguilera, por darme su apoyo y confianza, por toda su ayuda y consideración hacia mí.

A mi co-directora, la Dra. Elba Rodríguez, por toda la ayuda y apoyo que me brindó, y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

Al Dr. José Guadalupe Gómez, por su ayuda y disposición a apoyarme en el trabajo de laboratorio.

A mis sinodales, la Dra. Tércia Cesária Reis y al Dr. Gerardo Mariscal, por haber aceptado ser parte de mi comité, y por ayudarme con sus comentarios y sugerencias a la hora de evaluar mi desempeño en este trabajo de investigación.

A la Q.A. Aurora Jáuregui, la técnica del Laboratorio de Nutrición Animal, por su confianza, disposición y paciencia para ayudarme y enseñarme a utilizar los equipos del laboratorio.

A la M. en C. Susana Sosa, la técnica del Laboratorio de Microbiología por su disposición para ayudarme, resolver mis dudas y permitirme hacer uso de algunos de los equipos de dicho laboratorio.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Índice	vii
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades de las etapas productivas del cerdo	3
2.2 Etapa de destete	5
2.2.1 Problemáticas presentes en la etapa de destete	6
2.3 Alimentos y nutrimentos en el destete	7
2.4 Alimentos proteicos	10
2.4.1 Soya ( <i>Glycine max</i> )	11
2.5 Generalidades de las proteínas	13
2.5.1 Proteínas antigénicas del frijol de soya	15
2.6 Aspectos generales de la digestión de proteínas	18
2.6.1 Digestión de las proteínas antigénicas de la soya	23
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
VII. CONCLUSIONES	71
VIII. IMPLICACIONES	72
IX. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES DEL ESTUDIO	72
X. LITERATURA CITADA	73
XI. APÉNDICE	84

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Enzimas de la fase luminal de la digestión de proteínas	21
2	Composición de la dieta experimental de lechones destetados conteniendo pasta de soya	30
3	Composición de las dietas experimentales de lechones destetados conteniendo pasta de soya a diferentes niveles de inclusión.	35
4	Masa molecular de subunidades de proteínas alergénicas $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S)	41
5	Concentración como densidad específica de proteínas (DEP) de subunidades de las fracciones 7S y 11S de la pasta de soya presentado como media, mediana, moda, mínimos y máximos	46
6	Concentración como densidad específica de proteínas (DEP) en unidades arbitrarias ( $\text{INTxmm}^2/\mu\text{g}$ proteína) de las proteínas $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S) de acuerdo al origen de colecta de la pasta de soya (con suma de fracción contaminante).	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución electroforética de las proteínas 7S y 11S aisladas por el método de Liu <i>et al.</i> (2007). Adaptado de Liu <i>et al.</i> (2007).	17
2	Distribución electroforética de las proteínas 11S y 7S con los métodos de extracción de a. Liu <i>et al.</i> (2007), b. ReadyPrep 2D Cleanup Kit (Cat. 1632130) y el método de c. Wei <i>et al.</i> (2009).	37
3	Perfil electroforético mediante SDS-PAGE de la fracción 7S ( $\beta$ -conglucina) de pasta de soya mostrando los residuos presentes de la fracción 11S (glicina).	38
4	Distribución electroforética de subunidades pertenecientes a la fracción 7S ( $\beta$ -conglucina) de las pastas de soya (PS).	39
5	Perfil electroforético mediante SDS-PAGE de la fracción 11S (glicina) de pasta de soya mostrando los residuos presentes de la fracción 7S ( $\beta$ -conglucina).	39
6	Distribución electroforética de subunidades pertenecientes a la fracción 11S (glicina) de las pastas de soya.	40
7	Concentración (DEP) de subunidades de la proteína 7S en muestras de pasta de soya (sin suma de fracción contaminante)	42
8	Concentración (DEP) de subunidades de la proteína 11S en muestras de pasta de soya (sin suma de fracción contaminante).	43
9	Concentración (DEP) de subunidades de la proteína 11S en muestras de pasta de soya (con suma de fracción contaminante).	43

<b>10</b>	Concentración (DEP) de subunidades de la proteína 7S en muestras de pasta de soya (con suma de fracción contaminante).	44
<b>11</b>	Análisis de identidad de las proteínas en digestas de estómago, íleon y yeyuno mediante electroforesis 2 DE y Western blot; en la imagen se encuentran señalados los puntos correspondientes a las subunidades de 7S y 11S. A. Masa molecular y <i>pI</i> de subunidades de 7S y 11S. B. Localización de las proteínas correspondientes a subunidades de 7S y 11S.	49
<b>12</b>	Análisis proteómico diferencial de digestas a diferentes horas postconsumo a través de una SDS-PAGE 2DE. (Estómago 12 horas postconsumo [E12a,b,c; verde]; Estómago 3 horas postconsumo [E3a, b, c; naranja]. Íleon 12 horas postconsumo [I12a,b,c; morado]; Íleon 3 horas postconsumo [I3a,b,c; amarillo]. Yeyuno 3 horas postconsumo [Y3a,b,c; blanco])	51
<b>13</b>	Concentración de proteína (INT*Área) en digestas de estómago, yeyuno e íleon a diferentes horas postconsumo: 3 y 12 horas. *7S+11S: Concentración total de subunidades de las fracciones de 7S y 11S por órgano y hora.	54
<b>14</b>	Concentración total de las proteínas $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S) (INT*Área) en digestas de estómago, yeyuno e íleon a diferentes horas postconsumo: 3 y 12 horas.	59
<b>15</b>	Comparación representativa en 3D de la concentración de proteína glicina A3: $\approx$ 42 kDa/ <i>pI</i> 4.8, en muestras de digestas de íleon, usando anticuerpos policlonales. A. Íleon 12 horas postconsumo. B. Íleon 3 horas	60

	postconsumo. Factor de la escala: 0.003; a través de 3D viewer.	
16	Análisis proteómico diferencial de digestas ileales con diferente concentración de pasta de soya en la dieta a través de una SDS-PAGE 2DE (concentración de 15% [verde 15a, b, c]; concentración 20% [amarillo 20a, b, c]; concentración de 25% [morado 25a, b, c])	64
17	Concentración de proteína (INT*Área) en digestas de íleon con diferentes concentraciones de pasta de soya en dieta: 15%, 20% y 25%. * 7S+11S: Concentración total de subunidades de las fracciones de 7S y 11S por porcentaje de inclusión de pasta de soya.	68
18	Concentración total de las proteínas $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S) (INT*Área) en digestas ileales con diferente porcentaje de inclusión de pasta de soya en dieta: 15%, 20% y 25%.	69

## I. INTRODUCCIÓN

La industria porcina ha sido de gran importancia para la economía de muchos países, desde pequeños productores hasta grandes granjas tecnificadas (Huntzicker *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior, el cerdo es de los animales más consumidos en la actualidad, ya que su producción es altamente redituable debido a las rápidas ganancias de peso, la excelente conversión alimenticia y los kilogramos producidos por cerda al año (Pérez, 2007). En el ciclo de producción porcina hay diferentes etapas: gestación, lactancia, destete y finalización; entre ellas la etapa de destete destaca por ser la más crítica ya que en ella se presentan cambios importantes en la vida del lechón como son la adaptación al nuevo entorno, la alimentación y un sistema inmune en desarrollo (Thompson, 2003). Como consecuencia de todos los cambios anteriores, los lechones llegan a presentar pérdida de peso, bajo consumo de alimento y diarreas.

Dentro de la etapa de destete, el tracto gastrointestinal es el más afectado, debido principalmente al consumo de una dieta sólida basada en proteína de origen vegetal (Dunshea, 2007; García *et al.*, 2008). En relación a esto último, uno de los ingredientes más utilizados como proteína de origen vegetal es la pasta de soya, la cual se caracteriza por el alto aporte de proteína, y es considerada la de mayor valor nutritivo en esta clase de alimentos, sin embargo, posee un alto contenido de factores antinutricionales como son el inhibidor de tripsina, lectinas, ácido fítico y proteínas de reserva ( $\beta$ -conglucina o 7S y glicina o 11S), contribuyendo con ellos al daño del tracto gastrointestinal inmaduro (Tokach *et al.*, 2007; Gilani *et al.*, 2012). De estos factores antinutricionales, las proteínas de reserva son especialmente consideradas como las causantes de las reacciones de hipersensibilidad en lechones destetados, generando con ello alteraciones en la pared intestinal dañando la mucosa, y por consiguiente, afectando los procesos de digestión y absorción por atrofia de las vellosidades del intestino delgado, disminución en la digestibilidad, daño en la morfología intestinal, bajo crecimiento, poca ganancia diaria de peso, presencia de diarrea, pérdida de peso y

ocasionalmente muerte del lechón (Galbas *et al.*, 2011; Taliercio y Kim, 2013; Bu *et al.*, 2017).

Las proteínas de reserva o también llamadas proteínas antigénicas o alergénicas, son la proteína  $\beta$ -conglucina o fracción 7S, y la proteína glicina o fracción 11S. La glicina es una globulina, tiene una masa molecular de entre 300 y 380 kDa; posee cinco diferentes subunidades: G1 (A1aB1b, 53.6 kDa), G2 (A2B1a, 52.4 kDa), G3 (A1bB2, 52.2 kDa), G4 (A5A4B3, 61.2 kDa) y G5 (A3B4, 55.4 kDa). Cada una de estas subunidades puede ser dissociada en una cadena ácida de polipéptidos (A, 31-45 kDa) y una básica (B, 18-20 kDa). La fracción 11S tiene un punto isoeléctrico (pI) de 6.4. La proteína  $\beta$ -conglucina es un trímero de 140-180 kDa. Consiste en una subunidad  $\alpha'$  de aproximadamente 72 kDa, una subunidad  $\alpha$  de aproximadamente 68 kDa y una subunidad  $\beta$  de aproximadamente 52 kDa, posee un pI de 4.9 (Yang *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2012; Taliercio y Kim, 2013; Wang *et al.*, 2014).

Debido a los problemas que generan estas proteínas, y al ser la pasta de soya uno de los alimentos proteicos de origen vegetal más importantes en la nutrición porcina, es que se propuso identificar y cuantificar el contenido de las proteínas antigénicas (glicina y  $\beta$ -conglucina) en muestras de pastas de soya comerciales. Además evaluar la digestión de dichas proteínas antigénicas en diferentes tiempos y compartimentos del tracto gastrointestinal de lechones destetados alimentados con pasta de soya; así como valorar el efecto de la inclusión de niveles crecientes de pasta de soya en dietas libres de antibióticos para lechones destetados sobre la digestión de estas proteínas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

La industria porcina ha sido de gran importancia para la economía de muchos países, desde pequeños productores hasta grandes granjas tecnificadas (Huntzicker *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior, el cerdo es de los animales más consumidos en la actualidad, ya que su producción se encuentra altamente redituable debido a las rápidas ganancias de peso, la excelente conversión alimenticia y los kilogramos producidos por cerda al año (Pérez, 2007). A continuación, se presentan algunos aspectos referentes a la producción de cerdo, y los principales aspectos relacionados a la etapa de destete.

### 2.1 GENERALIDADES DE LAS ETAPAS PRODUCTIVAS DEL CERDO

#### **Gestación**

La duración de la gestación, en promedio es de 114 días. Durante este periodo, se debe de proveer de una alimentación adecuada a las cerdas ya que se busca mantener la gestación y el mayor número de lechones vivos; además de promover el crecimiento y desarrollo de los tejidos del aparato reproductor y los embriones, por lo que dicha alimentación no debe ser excesiva para evitar sobrepeso en la cerda (Bergmann *et al.*, 2004; Close y Cole, 2004). Al parto, los lechones llegan a pesar entre 1 y 1.5 kg (Huntzicker *et al.*, 2009); de acuerdo con Thompson (2003) necesitan ser protegidos de temperaturas extremas, por lo que se debe regular la temperatura. Durante el parto se debe asistir a la cerda si está presentando problemas durante el proceso.

#### **Lactancia y destete**

Durante la lactancia, la cerda debe tener el aporte adecuado de nutrientes para su propio mantenimiento y para la producción de leche, este último punto es muy importante, ya que, dependiendo de la cantidad y la calidad de la leche, será la supervivencia y el buen desarrollo y comportamiento de los lechones (Close y Cole, 2004). Éstos últimos, requieren especial cuidado, ya que nacen con bajos

niveles de energía, incapacidad para regular su temperatura corporal, además de que pueden ser fácilmente lastimados por la cerda (Huntzicker *et al.*, 2009). Deben tener acceso al calostro al instante en que nacen, ya que la mucosa intestinal es permeable ante casi cualquier proteína durante las primeras 24 horas (Pond *et al.*, 1991).

El destete es la remoción del aporte de leche materna al lechón y puede llevarse a cabo desde los 14 a los 30 días postparto (Gómez-Insuasti *et al.*, 2008; Huntzicker *et al.*, 2009). Reis de Souza *et al.* (2012), mencionan que cuando el destete es de forma natural, éste es realizado de manera gradual por la misma cerda entre las 15 y 22 semanas de edad de los lechones. De acuerdo con Mota-Rojas *et al.* (2014), cuando se desteta a una edad temprana (<21 días), esto puede ayudar a controlar la incidencia de enfermedades, pero también puede facilitar la aparición de vicios en los lechones como presencia de vocalizaciones, peleas y trompeteo del vientre. Es una etapa crítica, ya que se están adaptando al entorno, la alimentación y su sistema inmune está en desarrollo.

### **Crecimiento**

Esta etapa es menos crítica que la lactancia y el destete, y va desde esta última hasta llegar a los 50 ó 60 kg. Las necesidades nutricionales aumentan y cambian conforme el cerdo se desarrolla y crece, incluso son influenciadas por factores como el sexo, la genética, la edad, el estado fisiológico, o factores externos como estado sanitario, temperatura, etc. (Pérez, 2007; Ambi, 2011).

### **Finalización**

Esta es la fase final de la producción porcina, y sus principales objetivos junto con la etapa de crecimiento, son la eficiencia en la producción de tejido muscular y la producción de carne magra con características organolépticas y calidad aceptable. Durante esta etapa los requerimientos diferentes a la energía son menores, aunque la ingesta de alimento es mayor, entre un 75 y 80% del total del

alimento necesario para su vida productiva. Es por esta razón que se deben cuidar los costos de producción, ya que un mal manejo puede perjudicar la rentabilidad de la granja.

La etapa de finalización va desde los 50 a 60 kg hasta aproximadamente 100 a 110 kg, aunque dicho peso final depende del mercado y de la región, y conforma un periodo aproximado de 7 semanas (Ambi, 2011).

## 2.2 ETAPA DE DESTETE

Con el paso del tiempo, y en unidades de producción comerciales, el destete se lleva a cabo a edades más tempranas, en primera instancia, para aumentar el rendimiento reproductivo de la cerda (Gómez-Insuasti *et al.*, 2008). El lechón es muy dependiente de la cerda, de tal forma que cuando es destetado de manera temprana se desencadenan factores de estrés, entre los cuales, uno de los principales, es la dieta, la cual cambia bruscamente de un alimento líquido (leche), que es altamente digestible, a una dieta sólida, elaborada a base de cereales y de proteínas de origen vegetal, por lo que se debe tener especial cuidado en el aporte alimenticio, para evitar la movilización excesiva de las reservas energéticas del lechón (García *et al.*, 2008). Según Gómez (2007), otro punto importante es el cambio a un ambiente muy diferente al de estar cerca de la madre, donde los lechones desconocen todo y la temperatura ambiental es distinta; en conjunto con la exposición a fuentes de infección, aunado a un sistema inmune deficiente. Como consecuencia de todos los cambios anteriores, los lechones llegan a presentar pérdida de peso, bajo consumo de alimento y diarreas; éste periodo puede llegar a durar hasta 14 días, hasta que finalmente el lechón se recupera y puede continuar con su crecimiento normal.

Es necesario, proporcionar alimentos que ayuden a evitar el desarrollo de problemas digestivos, además de los derivados debido al estrés, por ello, se debe proveer de dietas adecuadas a la función, capacidad y adaptación digestiva del lechón (García *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Problemáticas presentes en la etapa de destete

Como ya se explicó, el destete es una etapa en la que existen factores estresantes, como lo son cambios nutricionales, medioambientales, psicológicos, del desarrollo intestinal y respuesta inmune (Pluske *et al.*, 2007; Gómez-Insuasti *et al.*, 2008).

Los principales cambios se dan en el tracto gastrointestinal, el cual tiene diversas y muy importantes funciones, entre las cuales están la absorción y digestión de nutrientes, producción de enzimas digestivas, e incluso es también una barrera de defensa contra los agentes patógenos externos, por lo que es uno de los principales afectados en el destete debido al estrés nutricional, dado por el repentino cambio de dieta, de líquido (leche) a sólido, y que este último, no siempre es el adecuado para un aparato digestivo aún inmaduro y con una baja actividad enzimática, a lo cual se le suma, un bajo consumo de alimento (Reis de Souza *et al.*, 2010; Contreras *et al.*, 2012; Campbell *et al.*, 2013).

Algunos de los cambios generados en los órganos del tracto gastrointestinal, son la baja motilidad gástrica, acortamiento en la altura de las vellosidades del intestino delgado, por lo que se genera una capacidad limitada de digestión y de absorción de nutrientes, respectivamente (Reis de Souza *et al.*, 2012; Campbell *et al.*, 2013; Heo *et al.*, 2013).

Según Contreras *et al.* (2012), se llega a presentar un cambio en la microbiota del intestino del lechón, aumentando las bacterias patógenas y provocando diarreas. Incluso pueden ocurrir reacciones de hipersensibilidad a nivel intestinal a causa de las proteínas vegetales incluidas en la dieta (Reis de Souza *et al.*, 2010).

De otra manera, si se sigue estimulando el consumo de alimento en los lechones posdestete, se ayudará en el desarrollo de la mucosa gástrica, del páncreas, intestino delgado e incluso de la microbiota no patógena; pero del

mismo modo, la estimulación puede ser adversa, y se puede desarrollar una microbiota patógena (Gómez-Insuasti *et al.*, 2008; Reis de Souza *et al.*, 2012).

La afección en la respuesta inmune, está relacionada con algunos de los cambios en el tracto gastrointestinal ya mencionados, como son el acortamiento en las vellosidades del intestino delgado, sumándose la inmunidad pasiva que decrece a la segunda semana posdestete, lo cual hace más vulnerables a los lechones ante el ambiente externo y enfermedades (Gómez-Insuasti *et al.*, 2008).

### **2.3 ALIMENTOS Y NUTRIMENTOS EN EL DESTETE**

La alimentación es una prioridad y está basada de acuerdo a los requerimientos nutricionales por etapa productiva de los cerdos, tomando en cuenta la edad, sexo, etapa fisiológica, peso, etc. (García-Contreras *et al.*, 2012).

Los alimentos o ingredientes se han agrupado en ocho clases con respecto a su composición y su uso en la formulación de dietas (NRC, 1982). En el caso de los monogástricos, específicamente en el destete, solamente se agrupan en cinco clases: alimentos energéticos (proveedores de carbohidratos no estructurales y/o grasas), alimentos proteicos (de origen vegetal y animal), suplementos minerales, suplementos vitamínicos, y aditivos.

Un alimento puede ser definido como cualquier componente de una dieta o ración, que aporta nutrimentos necesarios para el organismo del animal. Los nutrimentos son compuestos orgánicos y/o inorgánicos esenciales para los procesos metabólicos.

Según García-Contreras *et al.* (2012), una buena elección de las fuentes de alimentación, ayuda a mejorar la salud de los cerdos y de sus parámetros productivos. Por lo cual se debe tener especial cuidado en la elección de los alimentos o ingredientes, ya que estos de acuerdo a su fuente de proveniencia, tienen distintos niveles de nutrientes y procesamiento, e incluso de inocuidad.

Los cerdos necesitan diversos nutrimentos como grasas, carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales, y por supuesto, agua (Koeslag, 2008).

En el caso de las grasas y los carbohidratos, se busca incrementar y estimular su consumo, por lo que se recomienda que los ingredientes sean de alta palatabilidad, digestibilidad y alta concentración de energía neta (Tokach *et al.*, 2007). En el caso de las grasas, las cuales pueden ser sebos o aceites, al ser fuente de ácidos grasos esenciales, fuente importante de energía, generar facilidad para la absorción de vitaminas liposolubles e incluso auxiliares en la reducción de polvo en el alimento, es que su utilización en la alimentación para cerdos es de gran importancia. Algunos de los ingredientes utilizados como fuente de sebos y aceites son el aceite de pescado, sebo, aceites vegetales (canola, coco, girasol, soya, etc.). En cuanto a los carbohidratos, estos comparten una característica importante con las grasas, que es la de proveer energía al animal, y sus principales fuentes de estos son los cereales o derivados (García-Contreras *et al.*, 2012; NRC, 2012).

Al hablar de proteínas, su calidad depende de la proteína dietaria y de la capacidad de dicha proteína para proveer de cantidades y proporciones adecuadas de aminoácidos (NRC, 2012). Los aminoácidos pueden ser clasificados en esenciales y no esenciales. Los aminoácidos esenciales son aquellos que no pueden ser sintetizados por el organismo animal por lo que deben ser adicionados a la dieta; y son lo contrario a los aminoácidos no esenciales, los cuales pueden ser sintetizados por el propio organismo. Hay casos en los que la síntesis de algunos aminoácidos se encuentra limitada por la disponibilidad de cantidades adecuadas de nitrógeno metabólico, lo que quiere decir que las tasas de utilización de estos aminoácidos son mayores a su tasa de síntesis, debido a ello se les conoce como aminoácidos condicionalmente esenciales. Las dietas para cerdos, generalmente son hechas a base de cereales como maíz, sorgo, cebada o trigo, lo cuales proveen el 30% a 60% de los requerimientos totales de aminoácidos, por lo que es necesario agregar otras fuentes de proteína como

puede ser la pasta de soya, con la cual se asegura un aporte adecuado de aminoácidos esenciales. También es posible incluir aminoácidos de manera individual para incrementar el consumo de aminoácidos específicos. La lisina, es un aminoácido necesario en el cerdo destetado, y los requerimientos de otros aminoácidos van en relación al ya mencionado, y estos son la metionina, cisteína, isoleucina, triptófano, treonina y valina (Tokach *et al.*, 2007; Koeslag, 2008; NRC, 2012).

Las fuentes de minerales se pueden dividir en macrominerales (disponibles en la leche y en casi todos los alimentos proteicos, por lo que se puede estar seguro del aporte de estos en las necesidades nutricionales del lechón destetado) y microminerales (que son requeridos en cantidades pequeñas) (Tokach *et al.*, 2007; García-Contreras *et al.*, 2012). De acuerdo con Tokach *et al.* (2007) y Koeslag (2008), los macrominerales que principalmente necesitan los cerdos son el calcio, cloro, fósforo y sodio y los microminerales son cobre, yodo, hierro, manganeso, selenio y zinc.

En cuanto a las vitaminas dentro de la dieta para lechones destetados, deben suministrarse las de tipo liposoluble que son A, D, E, y K, y las hidrosolubles B<sub>12</sub>, biotina, colina, niacina, ácido pantoténico, tiamina, B<sub>6</sub> y riboflavina (Tokach *et al.*, 2007; NRC, 2012).

Actualmente, al momento de formular las dietas para los lechones destetados, se debe considerar que son estos los que deben adaptarse a dietas más sencillas y baratas; y como se sabe, el lechón es muy demandante de energía, por lo que se recomienda promover el consumo de alimento y por supuesto, se debe tomar en cuenta su fisiología digestiva, y elegir los ingredientes con más alto grado de digestibilidad (King y Pluske, 2007).

## 2.4 ALIMENTOS PROTEICOS

Existen dos fuentes de proteína, las de origen vegetal y las de origen animal (García-Contreras *et al.*, 2012).

Algunas de las fuentes de proteína de origen animal empleadas en el destete son:

a) **Plasma animal deshidratado:** Existe el plasma porcino y el plasma bovino. La inclusión de este ingrediente en las dietas de los cerdos radica en los niveles importantes de inmunoglobulinas, principalmente de IgG, incluso, los cerdos de los cuales se extraerá el plasma, han sido vacunados contra ciertas enfermedades con el fin de que produzcan dichas inmunoglobulinas. Otro aspecto importante es que estimula el consumo de alimento en los lechones. Contiene elevados niveles de cisteína, pero bajos niveles de metionina. Y aunque realmente aumenta el consumo de alimento, se trata de un alimento de costo elevado, por lo que es posible combinarlo con otras fuentes proteicas como la harina de pescado, harina de sangre o huevo entero deshidratado (Tokach *et al.*, 2007; Torrallardona, 2010).

b) **Concentrado de proteína de suero:** Es un alimento proteico de gran calidad, y que contiene un perfil de aminoácidos muy parecido al del plasma, por lo que resulta en una eficiencia similar a los resultados obtenidos con el plasma animal deshidratado. Además de lo anterior, su utilización en dietas para lechones está dada por los aminoácidos funcionales, factores de crecimiento, la estimulación en la producción de mucinas, entre otros, lo que contribuye a la protección de la mucosa intestinal (Tokach *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2016).

c) **Leche descremada desecada:** Aunque anteriormente era muy común incluirla en la dieta para lechones recién destetados, dejó de

utilizarse debido a que es cara y en lugar de aumentar el consumo de alimento, lo disminuye. Puede ser fácilmente sustituida por otros alimentos proteicos, que además de ser más baratos, también pueden incrementar los rendimientos (Tokach *et al.*, 2007).

d) **Harina de sangre:** Es un subproducto de la producción del plasma. Posee un alto nivel proteico (85-95%). Se menciona que se debe tener cuidado al incorporar este alimento proteico en dietas para lechones con un peso inferior a 5 kg, ya que puede llegar a disminuir el consumo de alimento. Tiene deficiencia en isoleucina y metionina (Tokach *et al.*, 2007).

Algunas de las fuentes de proteína de origen vegetal empleadas en el destete son:

a) **Proteína de papa:** Se menciona que posee aproximadamente un 85% de proteína. Puede utilizarse de forma combinada con otros alimentos proteicos en las dietas para lechones, ya que se menciona que no puede sustituir completamente el aporte proteico que da el plasma. Otra de las razones de su uso en la alimentación de los cerdos es para reemplazar la adición de antibióticos en las dietas debido a la presencia de péptidos antimicrobianos en dicho tubérculo (Jin *et al.*, 2008), respecto a ello, se han hecho estudios en los que se ha encontrado actividad antimicrobiana al disminuir el crecimiento de *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* (Lee, 2005). El inconveniente que presenta esta fuente de proteína es el alto nivel de alcaloides (Tokach *et al.*, 2007).

b) **Pasta de soya:** La soya es una de las fuentes de proteína más importantes y sus productos son utilizados ampliamente en la industria de los alimentos (Bu *et al.*, 2017).

#### 2.4.1 SOYA (*Glycine max*)

La soya es una leguminosa de ciclo anual perteneciente a la subfamilia de las Papilionáceas. La planta posee flores púrpuras o blanco-amarillento, y puede

llegar a medir de 50 a 150 cm. Las semillas crecen en vainas cortas, y cada vaina puede tener de una a cuatro semillas oleaginosas que varían en sus colores, desde amarillo, marrón, verde o negro (Ridner, 2006; Puppo *et al.*, 2007).

Es una planta originaria de Asia, formando parte importante de la alimentación en países como Japón y China. Se han encontrado registros de escritos acerca de la soya que datan desde el año 2838 A.C. Su introducción al continente americano fue a través de embarcaciones provenientes de Londres, con destino a Estados Unidos. En México, se introdujo a finales de los años 50 en Sonora, donde en la actualidad, junto con los estados de Sinaloa, Chihuahua, Tamaulipas y Chiapas se produce más dicho cultivo (ITESM y PRODUCE, 2003).

En México, el 97% de la producción de proteína de soya se destina para el consumo animal y el resto para consumo humano.

En el caso de la pasta de soya, esta es obtenida como producto residual de la extracción de aceite, y debido a que es una fuente importante de proteínas y minerales (calcio, hierro, cobre, fósforo y zinc), es muy utilizada en la formulación de las dietas para cerdos. Posee los aminoácidos esenciales como son la histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, cisteína, fenilalanina, tirosina, treonina triptófano y valina; pero es principalmente rica en lisina, triptófano y treonina, aunque deficitaria en metionina. De forma inconveniente es también un alimento con gran cantidad de factores antinutricionales como lo son los inhibidores de la tripsina, lectinas, ácido fítico, y proteínas de reserva ( $\beta$ -conglucina o 7S y glicina u 11S) (Ridner, 2006; Mariscal y Gómez, 2007; Tokach *et al.*, 2007; Gilani *et al.*, 2012). Las proteínas de reserva  $\beta$ -conglucina y glicina son altamente alergénicas (Hill, 2004).

Las proteínas de reserva, que como se mencionó son  $\beta$ -conglucina y glicina, se han considerado como una causa probable de reacciones de hipersensibilidad en los lechones destetados, presentándose afección en los procesos de absorción por atrofia de las vellosidades del intestino delgado, disminución en la

digestibilidad por reducción de secreción de enzimas digestivas, inflamación de la mucosa intestinal, daño en la morfología intestinal, bajo crecimiento y diarreas, e incluso de forma eventual la muerte en los lechones destetados (Tokach *et al.*, 2007; Bu *et al.*, 2017).

## 2.5 GENERALIDADES DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes a nivel biológico y alimentario, son compuestos orgánicos complejos constituidos por 20  $\alpha$ -aminoácidos. Desempeñan diversas funciones: algunas transportan moléculas, también las hay de tipo estructural en células y tejidos, son enzimas, forman parte del sistema de defensa del organismo, funcionan como receptores y como hormonas. En el caso de los alimentos, las funciones de las proteínas están relacionadas a características fisicoquímicas y estructurales (Champe *et al.*, 2006; Mathews *et al.*, 2013).

### Las proteínas se clasifican en:

1. Las proteínas pueden clasificarse como *simples* o *complejas*: Las proteínas simples solo se forman por sus cadenas polipeptídicas. Y las proteínas complejas, además de tener sus cadenas polipeptídicas, tienen otros componentes ya sean orgánicos o inorgánicos que reciben el nombre de grupo prostético. Como por ejemplo las fosfoproteínas (contienen ácido fosfórico), glicoproteínas (conjugadas con heteroglicanos), lipoproteínas (conjugadas con triacilgliceroles y colesterol), etc. (McDonald *et al.*, 2002).
2. A su vez, y de acuerdo a su forma y composición química, se dividen en *fibrosas* y *globulares*. En el caso de las proteínas fibrosas son alargadas o filamentosas. Se caracterizan por realizar funciones estructurales en las células; ejemplos importantes son las queratinas, las fibroínas, el colágeno

y la elastina. Son muy resistentes e insolubles en agua o disoluciones salinas diluidas (Mathews *et al.*, 2013).

Las proteínas globulares se diferencian de las proteínas fibrosas, en que sus cadenas polipeptídicas se pliegan de forma compacta, de manera que adoptan formas esféricas o globulares compactas, mientras que las proteínas fibrosas son filamentosas. La mayoría de este tipo de proteínas son solubles en sistemas acuosos. En este grupo encontramos a las enzimas, antígenos y hormonas proteicas: *albúminas*, hidrosolubles y coagulan con el calor; *histonas*, proteínas que se encuentran en los núcleos celulares; *protaminas*, que se encuentran unidas a los ácidos nucleicos y *globulinas*, se encuentran en huevo, leche, pero principalmente en semillas (Mathews *et al.*, 2013).

### **Desnaturalización y cambios en las proteínas**

El proceso de desnaturalización se da cuando una proteína se ve afectada en su estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, mediante la adición de un químico, o por cambios físicos, lo que genera la ruptura de muchos enlaces no covalentes, interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno. Generalmente, las proteínas globulares se ven afectadas por el aumento de temperatura, cambios en el pH y por interacción con agentes químicos. Un ejemplo de agente químico es el dodecilsulfato de sodio (SDS), que es un detergente y tiene tanto un extremo polar como uno no polar, lo que genera que un extremo interactúe con el agua y el otro con los grupos no polares que se encuentran en el interior de la estructura proteica, lo cual causa distorsión en la estructura espacial de dicha proteína. En el caso de la desnaturalización por temperatura, hay ruptura de varios enlaces intermoleculares e intramoleculares, lo que resulta en un cambio en la organización de las estructuras secundarias y terciarias en el cual los aminoácidos que son hidrofóbicos y que se encontraban orientados hacia el interior de la estructura proteica, ahora son expuestos hacia el solvente. En el caso de la adición de  $\beta$ -mercaptoetanol para la desnaturalización en SDS-PAGE, es que este

agente químico, rompe los enlaces disulfuro separando así las subunidades que componen a la proteína de interés (Mathews *et al.*, 2013).

### 2.5.1 PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DEL FRIJOL DE SOYA

Las proteínas de reserva o también llamadas alergénicas o antigénicas son moléculas pertenecientes a la superfamilia de las cupinas, las cuales tienen dominios característicos en forma de barril de doble hélice  $\beta$ . Dentro de dicha familia, existen tres tipos de proteínas, en dos de ellas se encuentran englobadas nuestras proteínas de interés: globulinas 11S o leguminas y 7S o vicilinas. Estas proteínas tienen poca similitud entre ellas, excepto por su estructura tridimensional que es similar (San Miguel-Hernández *et al.*, 2012).

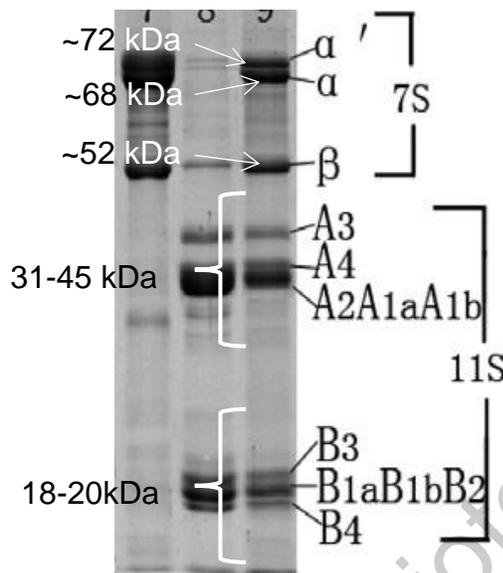
Las proteínas de reserva  $\beta$ -conglucina y glicinina, forman parte de los factores antinutricionales presentes en el frijol de soya (*Glycine max*). Estas proteínas de reserva representan el 53.12% y 31.37% de la proteína total, respectivamente, en el frijol de soya. No tienen función fisiológica y son sintetizadas en grandes cantidades durante la formación de la semilla para finalmente ser utilizadas en la germinación donde los productos resultantes de la proteólisis (aminoácidos) son los que se utilizan en el crecimiento de la planta. Estas proteínas son la causa de alergias en humanos y animales, generando signos y síntomas en órganos que incluyen piel, tracto gastrointestinal, respiratorio, etc. (Deng *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

Los efectos de las reacciones alérgicas que generan estas proteínas en lechones recién destetados es atrofia de vellosidades duodenales, disminución en la digestibilidad y absorción de nutrientes, diarrea, lo que se traduce en crecimiento lento, ganancia diaria de peso más lenta que en animales en los que su dieta no contiene soya (Galbas *et al.*, 2011; Taliercio y Kim, 2013; Bu *et al.*, 2017). Peng *et al.* (2018), mencionan que la proteína 7S induce daño intestinal al inhibir el crecimiento de células intestinales, y que dicha afección es mayor que el

generado por la proteína 11S, lo cual también concuerda con lo mencionado por Wu *et al.* (2016b).

Chen *et al.* (2011) observaron que la  $\beta$ -conglucina incrementa la expresión de proteínas relacionadas a la apoptosis, estrés e inflamación, pero decrece la expresión de proteínas relacionadas al citoesqueleto y replicación nuclear en células intestinales; confirmaron un incremento en la expresión de caspasa-3 en estudios *in vitro* e *in vivo* en lechones destetados. La atrofia de las vellosidades resulta en una mala absorción, provocando reducción en el crecimiento e incremento en la incidencia de enfermedades intestinales como la enteritis.

La glicinina es una globulina o legumina, también conocida como fracción 11S (Figura 1), tiene una masa molecular de entre 300 y 380 kDa; posee cinco diferentes subunidades: G1 (A1aB1b, 53.6-56 kDa), G2 (A2B1a, 52.4-54 kDa), G3 (A1bB2, 52.2-54 kDa), G4 (A5A4B3, 61.2-64 kDa) y G5 (A3B4, 55.4-58 kDa). Cada una de estas subunidades puede ser disociada en una cadena ácida de polipéptidos (A, 31-45 kDa) y una básica (B, 17-22 kDa), estas cadenas se encuentran unidas por puentes disulfuro. A estas cadenas se les ha catalogado como importantes alérgenos. Las subunidades pueden ser agrupadas de acuerdo a su similitud en dos grupos: Grupo 1 contiene G1, G2, y G3, y son ricas en metionina; el grupo 2 contiene a G4 y G5, y son pobres en metionina. Esta fracción 11S tiene un pI de 6.4, y el de cada una de sus subunidades: A<sub>x</sub>: 4.2-5.5; B<sub>x</sub>: 6.5-8.5 (Yang *et al.*, 2011; Taliercio y Kim, 2013; Wang *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Distribución electroforética de las proteínas 7S y 11S aisladas por el método de Liu *et al.* (2007). Adaptado de Liu *et al.* (2007).

La glucoproteína o vicilina  $\beta$ -conglucina es un trímero, y es conocida como fracción 7S (Figura 1), tiene una masa molecular total de 180 kDa y contiene restos de carbohidratos que constituyen aproximadamente el 5% del total de la proteína, lo cual, Wang *et al.* (2014) consideran que está relacionado a su inmunoreactividad. Esto último debido a que dicha glicosilación contiene uniones que no se encuentran en las glucoproteínas presentes en mamíferos, sino que son comunes en plantas, semillas e invertebrados, lo que conlleva a que sean altamente inmunogénicas (Van Ree, 2002). Pueden llegar a tener entre uno y dos sitios de glicosilación (Mills *et al.*, 2002). Su estructura cuaternaria se encuentra unida por enlaces hidrofóbicos y puentes de hidrógeno (Amigo-Benavent *et al.*, 2009). Esta glucoproteína consiste en una subunidad  $\alpha'$  de aproximadamente 72 kDa, una subunidad  $\alpha$  de aproximadamente 68 kDa y una subunidad  $\beta$  de aproximadamente 52 kDa. Las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  son muy similares entre si respecto a su cadena de aminoácidos. En el caso de la subunidad  $\beta$ , esta no contiene cisteína y metionina, pero sí una gran cantidad de aminoácidos

hidrofóbicos o no polares (Krishnan y Nelson, 2011; Deng *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015).

Según Wang *et al.* (2014), la fracción 7S se puede fraccionar en seis componentes  $\alpha'\beta$  (B1-),  $\alpha\beta$  (B2-),  $\alpha\alpha'\beta$  (B3-),  $\alpha\beta$  (B4-),  $\alpha\alpha'$  (B5-) y  $\alpha$  (B6-). Los componentes B1- y B2-conglicinina se encuentran en su mayoría constituidas por la subunidad  $\beta$ ; mientras que los componentes B3- a B6-, están compuestos por la subunidad  $\alpha$ . Esta proteína posee un *pI* de 4.9, y el de cada una de las subunidades:  $\alpha'$ , 5.18-5.3;  $\alpha$ , 4.9-5.2;  $\beta$ , 5.6-6.2 (Wang *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015).

## 2.6 ASPECTOS GENERALES DE LA DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS

La digestión se define como el proceso en el cual se fragmentan y transforman los nutrimentos presentes en el alimento, a moléculas simples y de fácil absorción. En general, consta de una transformación tanto física como enzimática de las partículas del alimento y de los componentes químicos presentes en él y que pueden ser absorbidos. La transformación física inicia con la masticación y permite que la superficie de contacto del alimento sea más amplia y quede expuesta a la acción de las enzimas digestivas. Dicho proceso de transformación se completa con la acción digestiva del estómago, facilitada por la pepsina y el ácido clorhídrico, que se encargan de desnaturalizar las proteínas (origen animal o vegetal). La reducción del tamaño de partícula del alimento ingerido de forma física, se considera que ha finalizado cuando el bolo alimenticio abandona el estómago (Herdt, 2009).

La digestión enzimática se lleva a cabo mediante la hidrólisis, que es un proceso por el cual los enlaces glucosídicos en los carbohidratos, los enlaces peptídicos en las proteínas, los enlaces éster en las grasas y los enlaces fosfodiéster en los ácidos nucleicos, se rompen por la acción de la adición de una molécula de agua en cada enlace durante la digestión. Estas reacciones son catalizadas por las enzimas presentes en el tracto digestivo (Herdt, 2009).

*Digestión en estómago:* La superficie interna del estómago se encuentra dividida en cuatro partes: la región esofágica, la región cardial, la región glandular y la región pilórica. En la región glandular se lleva a cabo la producción de ácido clorhídrico (HCl) y pepsinógeno, entre otras mucinas. El proceso de digestión inicia con la liberación de gastrina en el estómago, la cual se produce cuando las microvellosidades de las células G, que se encuentran en la mucosa del antro, entran en contacto con la proteína presente en el alimento. A su vez, la gastrina liberada estimula a las células enterocromafines (ECL) que se encargan de liberar histamina, la cual estimula a las células parietales para secretar HCl. Una segunda vía de estímulo de la gastrina es que actúe directamente sobre las células parietales para que secreten HCl. A su vez, el ácido clorhídrico activa el pepsinógeno para convertirlo en pepsina (McDonald *et al.*, 2002; Argenzio, 2004).

A continuación, la pepsina entra en contacto con las proteínas para su hidrólisis, teniendo preferencia por los enlaces peptídicos próximos a los aminoácidos aromáticos como son la fenilalanina, triptófano y tirosina. También actúa en los enlaces donde intervienen el ácido glutámico y la cisteína. Los productos que pasan al intestino delgado son polipéptidos de longitud de cadena variable y algunos aminoácidos (McDonald *et al.*, 2002).

En el estómago es donde se inicia la fase luminal de la digestión debido a la actividad del HCl y la pepsina, para completarse en el intestino delgado con la acción de las enzimas pancreáticas (Herdt, 2009).

*Digestión en el intestino delgado:* Al intestino delgado llegan los alimentos parcialmente digeridos provenientes del estómago para mezclarse con secreciones biliares, duodenales y pancreáticas. Esta mezcla se da en la región duodenal, y en el yeyuno se lleva cabo la absorción de nutrientes. En el intestino delgado se lleva a cabo un proceso de digestión químico por la acción de las enzimas pancreáticas y las intestinales; y es la parte final de la fase luminal de la digestión de proteínas. Dicho proceso de digestión se caracteriza por requerir gran

cantidad de enzimas proteolíticas para poder llevarse a cabo. En esta fase, cuando los productos de la digestión, entre ellos los péptidos, entran en el duodeno, se libera la hormona colecistoquinina (pancreozimina), la cual estimula la secreción de enzimas y proenzimas como el tripsinógeno, quimotripsinógeno, procarboxipeptidasas A y B, proelastasa, entre las cuales también se encuentran la  $\alpha$ -amilasa, lipasa, lecitinasas y nucleasas, por parte del páncreas. Estas enzimas trabajan óptimamente a un pH de entre 7 y 9. Las enzimas proteolíticas mencionadas, son inicialmente secretadas en una forma inactivada para evitar la digestión de la propia célula que las produce. La posterior activación de estos zimógenos, se da dentro de la luz intestinal (McDonald *et al.*, 2002).

El tripsinógeno se activa como tripsina por acción de la enteroquinasa, la cual se libera en la mucosa duodenal. A su vez, la tripsina activa al quimotripsinógeno, convirtiéndolo en quimotripsina. La tripsina actúa sobre los enlaces peptídicos de la lisina y arginina, específicamente; y la quimotripsina es específica para los enlaces peptídicos de los grupos carboxilo de la tirosina, triptófano, fenilalanina y leucina. La tripsina también activa a la procarboxipeptidasas para convertirlas en carboxipeptidasas, las cuales actúan sobre los péptidos del final de la cadena, al escindir los aminoácidos terminales que tienen un grupo  $\alpha$ -carboxilo libre. Debido a lo anterior, a estas enzimas se les llama exopeptidasas; y a la tripsina y quimotripsina, endopeptidasas, ya que atacan los enlaces peptídicos del interior de la cadena proteica, En el Cuadro 1 se muestran las distintas enzimas (endopeptidasas y exopeptidasas) que actúan en la fase luminal de la digestión (McDonald *et al.*, 2002; Argenzio, 2004; Herdt; 2009).

**Cuadro 1.** Enzimas de la fase luminal de la digestión de proteínas

ENZIMA	ACCIÓN	ORIGEN	PRECURSOR	ACTIVADOR
<b>Pepsina</b>	Endopeptidasa	Glándulas gástricas	Pepsinógeno	HCl, pepsina
<b>Quimiosina (renina)</b>	Endopeptidasa	Glándulas gástricas	Quimiosinógeno	
<b>Tripsina</b>	Endopeptidasa	Páncreas	Tripsinógeno	Enteroquinasa, tripsina
<b>Quimiotripsina (renina)</b>	Endopeptidasa	Páncreas	Quimiotripsinógeno	Tripsina
<b>Elastasa</b>	Endopeptidasa	Páncreas	Proelastasa	Tripsina
<b>Carboxipeptidasa A</b>	Exopeptidasa	Páncreas	Procarboxipeptidasa A	Tripsina
<b>Carboxipeptidasa B</b>	Exopeptidasa	Páncreas	Procarboxipeptidasa B	Tripsina

Herdt, 2009

En el caso de la fase membranosa de la digestión, al igual que la fase luminal, esta se da por la acción hidrolítica de las enzimas, y se lleva a cabo en la mucosa del enterocito, donde los péptidos se hidrolizan a aminoácidos individuales. En esta fase las enzimas permanecen unidas a la superficie apical de los enterocitos, donde son producidas, de esta manera, el sustrato debe de entrar en contacto con el epitelio para que las enzimas puedan hidrolizarlo (oligopeptidasas intracelulares). Para llevarse a cabo este proceso, se forma una especie de microambiente en la capa superficial, que se forma de una capa acuosa, secreción mucosa intestinal y glucocáliz, de esta manera, los productos obtenidos se quedan en el mismo lugar, ya no regresan a la luz intestinal, y por tanto son absorbidos.

En el caso de la digestión de las proteínas, son las aminopeptidasas las que se encuentran en la superficie apical de los enterocitos, estas enzimas hidrolizan los péptidos provenientes de la fase luminal y actúan en el enlace peptídico próximo al grupo amino libre de los péptidos cortos, produciendo aminoácidos libres. En algunas ocasiones los péptidos de cadena larga son digeridos de manera incompleta, produciéndose dipéptidos y tripéptidos, estos a su vez, pueden ser perfectamente absorbidos, al contrario de los carbohidratos en que solo los monómeros y azúcares simples se pueden absorber. Estos dipéptidos y tripéptidos son absorbidos y posteriormente hidrolizados por las dipeptidasas intracelulares, produciéndose así, aminoácidos libres que son absorbidos a través de las membranas apicales de los enterocitos mediante un mecanismo de cotransporte dependiente de Na, después pueden pasar a través de la membrana basolateral hacia la sangre venosa portal por transportadores de difusión facilitada. Así, la digestión final de estos péptidos puede llevarse a cabo en la membrana apical del enterocito o en el interior de este (McDonald *et al.*, 2002; Argenzio, 2004; Herdt, 2009).

Cuando cierta cantidad de proteína escapa a la digestión en el intestino delgado, ésta pasa a intestino grueso, donde se lleva a cabo la descomposición microbiana de las proteínas. En este caso, los péptidos y aminoácidos resultantes son utilizados para la síntesis de proteína microbiana (Argenzio, 2004).

### 2.6.1. DIGESTIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE LA SOYA

Las proteínas que son susceptibles a la digestión gastrointestinal se les considera que son más seguras que aquellas que se mantienen estables o resistentes a la digestión, ya que estas se relacionan a las alergias (Astwood *et al.*, 1996). De acuerdo a lo anterior, Hill (2004), menciona que las proteínas de las leguminosas involucradas en reacciones inmunes son aquellas que permanecen indigestibles por largo tiempo en el intestino delgado y en el tracto digestivo. Según Moreno (2007), las proteínas de reserva presentes en las leguminosas, generalmente son resistentes a la desnaturalización térmica y la proteólisis. Mills *et al.* (2002), mencionan que incluso, el grado de digestión depende del tipo de procesamiento que hayan tenido previamente estas globulinas de reserva

En pruebas de digestibilidad, se ha demostrado que las proteínas alergénicas de la soya comienzan a ser digeridas en el estómago, pero de una forma limitada, y que la concentración de estas puede llegar a disminuir hasta más de 50% en dicho órgano. En el yeyuno, la degradación de estas proteínas es más rápida, lo cual se relaciona con que en esta parte del intestino delgado hay actividad de enzimas como la tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y aminopeptidasa (Zhao *et al.*, 2008). En pruebas *in vitro*, según Zhao *et al.* (2010), la estabilidad de la  $\beta$ -conglucina ante la pepsina, es alta, principalmente para la subunidad  $\beta$ ; en el caso de la cadena básica (B) de glicina esta fue más resistente a la hidrólisis con tripsina; por lo que lo más efectivo para la hidrólisis de ambas proteínas, fue la cooperación de las dos enzimas, pepsina y tripsina.

Cuando la proteína glicina (11S) ha sufrido proteólisis, ya sea con tripsina o quimotripsina, forma estructuras intermedias estables conocidas como glicina-T o glicina-C, en las que gran parte de la estructura cuaternaria de la proteína nativa se conserva. En el caso de la proteína  $\beta$ -conglucina (7S), después de la tripsinólisis también hay formación de estructuras intermedias estables para cada una de las subunidades de esta fracción (Mills *et al.*, 2002). Aunque en general, los polipéptidos de  $\beta$ -conglucina son bastante resistentes, y pueden sobrevivir el

tránsito a través del estómago y el intestino delgado (Amigo-Benavent *et al.*, 2011). Zhao *et al.* (2008), mencionan que la proteína 7S es aparentemente más resistente a la digestión que la proteína 11S en lechones.

Estudios *in vitro* han revelado que la glicosilación presente en la glucoproteína  $\beta$ -conglucina es la responsable de su resistencia a la proteólisis, ya que al ser desglucosilada, dicha proteína es completamente hidrolizada; de lo contrario, esta resistencia puede permitir que pequeñas cantidades de la proteína inmunogénicamente activa, sean absorbidas por las células intestinales y de esta manera generar una respuesta inmune (Amigo-Benavent *et al.*, 2011).

Debido a lo anterior y a la gran demanda de productos de origen animal por parte de una población creciente, y por ende a una mayor producción porcina y a una gran importación de pasta de soya para la alimentación animal es necesario evaluar el contenido de proteínas antigénicas (glicina y  $\beta$ -conglucina) en diferentes muestras de pastas de soya comerciales empleadas para elaborar alimentos balanceados en la zona del Bajío. Este conocimiento será una herramienta importante para los nutriólogos, ya que les permitirá saber si las proteínas antigénicas se presentan en cantidades similares o diferentes entre las pastas de soya, ya que su procedencia no es la misma en la mayoría de los casos, contándose hasta con pastas de soya modificadas con un menor contenido de FAN. Además también podrá ayudar a evitar problemas de salud intestinal y por ende productivos, principalmente en la etapa de destete, que generan dichas proteínas antigénicas. Aunado a lo anterior, es importante conocer la digestión de las fracciones de las proteínas antigénicas en diferentes tiempos y compartimentos del tracto gastrointestinal en lechones destetados alimentados con pasta de soya para identificar las fracciones indigestibles que posiblemente estén relacionadas con los problemas gastrointestinales ya mencionados. También es importante valorar el efecto de la inclusión de niveles crecientes de pasta de soya en dietas libres de antibióticos para lechones destetados sobre la digestión de las fracciones que conforman las proteínas antigénicas y poder

establecer el nivel óptimo de inclusión de pasta de soya donde no se comprometa su digestión.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

### **III. HIPÓTESIS**

- La concentración de proteínas antigénicas (Glicinina y  $\beta$ -conglucina) será igual entre las pastas de soya, y de acuerdo al origen de colecta.
- De acuerdo a los tiempos de digestión se encontrará mayor concentración de proteínas antigénicas indigeribles en la parte final del intestino delgado.
- A mayor nivel de inclusión de pasta de soya en la dieta se encontrará mayor concentración de proteínas antigénicas indigeribles en el íleon de lechones destetados.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar y cuantificar las proteínas antigénicas en pastas de soya comerciales y evaluar su presencia en diferentes compartimentos del tracto digestivo de lechones destetados alimentados con dietas conteniendo pasta de soya.

#### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Extraer, separar, identificar y cuantificar las proteínas antigénicas (glicinina y  $\beta$ -conglucina) de pastas de soya comerciales provenientes de diferentes plantas de alimentos balanceados.
- Identificar y cuantificar la concentración de las proteínas antigénicas digeribles e indigeribles de pasta de soya en diferentes tiempos de digestión presentes en compartimentos del tracto digestivo de lechones destetados alimentados con pasta de soya.
- Identificar y cuantificar la concentración de las proteínas antigénicas indigeribles de pasta de soya presentes en íleon de lechones destetados alimentados con diferentes niveles de pasta de soya.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de tesis se encuentra conformado por tres experimentos:

### EXPERIMENTO 1

Este experimento consistió en la extracción, separación, identificación y cuantificación de proteínas antigénicas ( $\beta$ -conglucina y glicina) de 14 muestras de pastas de soya comerciales utilizadas para la elaboración de raciones en Querétaro, provenientes de tres plantas de alimentos balanceados: AGLQ (5 muestras), NUTEC (8 muestras) y CENID-INIFAP (1 muestra).

Cada muestra de pasta de soya fue molida a través de una malla de 0.5 mm y luego desgrasada mediante el método de extracción de grasa en frío (Folch *et al.*, 1957). Posteriormente, para la extracción de las proteínas antigénicas (glicina y  $\beta$ -conglucina), se empleó el método descrito por Liu *et al.* (2007) basado en el punto isoeléctrico ( $pI$ ) de las proteínas antes mencionadas (Apéndice 1).

Después de realizado el método de extracción de las proteínas antigénicas, se determinó la concentración de proteínas en cada fracción liofilizada mediante la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951).

Una vez obtenida la concentración de proteínas en las fracciones liofilizadas, se prosiguió a desnaturalizar (calentamiento y adición de SDS) y reducir cada fracción con  $\beta$ -mercaptoetanol para romper enlaces disulfuro.

Cabe mencionar que se probaron otros métodos de extracción de las fracciones 7S y 11S con el fin de observar la mejor resolución obtenida en su perfil electroforético y compararlo con el método de Liu *et al.* (2007). Para lo anterior, se utilizó el ReadyPrep 2D Cleanup Kit (Cat. 1632130), y una extracción basándose en el método de Wei *et al.* (2009) (Apéndice 3). Realizados los métodos anteriores, antes de cargar las muestras obtenidas en un gel de acrilamida, estas fueron centrifugadas una vez más y el sobrenadante fue el que se utilizó. A continuación, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE (SDS-*polyacrylamide*

*gel electrophoresis*) (Laemmli, 1970) al 15%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 y se digitalizaron mediante un fotodocumentador Bio-Rad para analizar los geles por medio del programa Image Lab de Bio-Rad.

Posteriormente se separaron, identificaron y analizaron las subunidades de las fracciones proteicas  $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S) de cada muestra de pasta de soya extraída con la técnica de Liu *et al.* (2007) mediante electroforesis SDS-PAGE (SDS-*polyacrylamide gel electrophoresis*) (Laemmli, 1970), a una concentración de 12% de acrilamida. En cada pozo de los geles se cargaron 25  $\mu$ l de muestra con una concentración de 0.6  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteína. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 y se digitalizaron mediante un fotodocumentador Bio-Rad, para analizar los geles por medio del programa Image Lab de Bio-Rad y estimar la masa molecular (MM) de cada subunidad de las fracciones 7S y 11S. Se comparó su movilidad electroforética con la de un estándar de peso molecular de proteínas de amplio espectro Broad Range de Bio Rad (Cat. 161-0317), y con la masa molecular del inhibidor de tripsina de soya (*Glycine max*) de Sigma (T9128 1G), además de un estándar de proteína (albúmina sérica bovina) de Sigma (P9369 5 ML).

Habiéndose identificado cada banda de las subunidades de cada fracción proteica 7S y 11S de cada muestra de pasta de soya, se estimó la concentración de proteína de cada banda mediante el programa Quantity One de Bio-Rad, expresándose como densidad específica de proteínas (DEP) en unidades arbitrarias (INTx $\text{mm}^2$ / $\mu$ g proteína).

Las diferencias entre la masa molecular de las subunidades de las proteínas antigénicas (7S y 11S) de las pastas de soya; así como el efecto del origen de colecta de dichas pastas (AGLQ y NUTEC) sobre la concentración (DEP) de las subunidades de las proteínas antigénicas (7S y 11S) fueron evaluadas mediante un diseño completamente al azar y para comparar las medias se utilizó la prueba de Tukey (<0.05) (Steel y Torrie, 1980) empleando el paquete estadístico SAS. La

muestra del INIFAP-CENID no se pudo incluir en la comparación en concentración (DEP) de las subunidades de las fracciones 7S y 11S en cuanto a procedencia, ya que solamente se contó con una muestra.

Las concentraciones (DEP) de las subunidades de las fracciones 7S y 11S de las muestras de pasta de soya fueron evaluadas mediante una estadística paramétrica obteniendo media, moda, mediana, mínimos y máximos empleando el paquete estadístico SPSS versión 18.

## **EXPERIMENTO 2**

Se evaluaron 12 muestras de contenidos digestivos (estómago, yeyuno e íleon) de lechones recién destetados alimentados con pasta de soya con un porcentaje de inclusión en dieta del 20%, y colectados a dos tiempos de digestión. Las muestras provinieron de un experimento previo, donde se emplearon 12 lechones cruza de Fertilis 20 x G Performance (Genetiporc®), destetados en promedio a los  $21 \pm 0.8$  días de edad, con un peso de  $7.1 \pm 0.5$  kg al destete. Los lechones se alimentaron con una dieta a base de pasta de soya (Cuadro 2) durante 14 días. Posteriormente, seis lechones fueron sacrificados a las 3 y 12 horas postconsumo, y se obtuvieron los contenidos digestivos de estómago, yeyuno e íleon, los cuales fueron liofilizados y desgrasados en frío (Folch *et al.*, 1957).

Las muestras de los contenidos digestivos liofilizados y desgrasados se emplearon para evaluar la digestión de las subunidades de las proteínas antigénicas (glicinina y  $\beta$ -conglucina) en diferentes compartimentos digestivos (estómago, yeyuno e íleon) a dos tiempos de digestión (3 y 12 horas).

Para evaluar la digestión de las subunidades de las proteínas antigénicas (glicinina y  $\beta$ -conglucina) en los contenidos digestivos fue necesario producir anticuerpos contra esas proteínas.

**Cuadro 2.** Composición de la dieta experimental de lechones destetados conteniendo pasta de soya.

<b>Ingredientes, %</b>	<b>Dieta pasta de soya</b>
Almidón de maíz	37.50
CFC <sup>1</sup>	4.00
Pasta de soya	20.00
Caseína	14.40
Aceite de maíz	5.62
Lactosa	12.60
Sal	0.50
Carbonato de calcio	0.40
Fosfato dicálcico	3.50
Premezcla de minerales <sup>2</sup>	0.12
Premezcla de vitaminas <sup>3</sup>	0.36
Gustor	0.20
AminoGut	0.80

<sup>1</sup>Concentrado de fibra cruda Arbocel®

<sup>2</sup>Premezcla de minerales que aporta por Kg. de dieta: cobalto 0.72 mg, cobre 14.4 mg, hierro 120 mg, manganeso 36 mg, selenio 0.30 mg, iodo 0.96 mg, zinc 144 mg

<sup>3</sup>Premezcla de vitaminas que aporta por Kg. de dieta: vit. A 10,200 UI, vit. D 1980 UI, vit. E 60 UI, vit. K 1.2 mg, riboflavina 7.2 mg, cianocobalamina 0.04 mg, niacina 36 mg, ácido pantoténico 16.55 mg, tiamina 0.30 mg, piridoxina 0.31 mg, biotina 0.08 mg, ácido fólico 0.75 mg

***Producción de anticuerpos anti-glicinina y anti-β-conglicinina:***

La presencia y concentración de las proteínas a evaluar fue determinada a través de la técnica de *Western blot*, para lo cual se requirió de la producción de anticuerpos contra estas proteínas. Se utilizaron cinco conejos de raza Nueva Zelanda de dos meses y medio de edad y un peso promedio de  $2.1 \pm 0.15$  kg: dos conejos para la producción de anticuerpos para glicinina (con inóculo); dos

conejos para la producción de anticuerpos para  $\beta$ -conglucina (con inóculo) y uno de control sin inóculo siguiendo la metodología de Gómez-Soto *et al.* (2017).

La preparación de la proteína para inoculación se realizó a través del extracto proteico correspondiente a cada proteína antigénica (glicina y  $\beta$ -conglucina). Sin embargo, las fracciones que se obtuvieron mostraron contaminación, por lo que se hicieron las respectivas separaciones electroforéticas con las características ya descritas previamente (pág. 28), a excepción de que se utilizaron geles preparativos al 12% y el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards de Bio-Rad (Cat. 1610374). En cada gel (con un solo pozo) se cargaron 400  $\mu$ l de muestra con una concentración de 7.5  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteína. Los geles no fueron teñidos, en su lugar se hicieron electrotransferencias a membranas de nitrocelulosa 0.45  $\mu$ m de Bio-Rad (Cat. 1703965) a un voltaje de 20 V por 20 minutos. Posteriormente, dichas membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau 0.1% por algunos segundos, y al hacerse visibles las bandas proteicas, se prosiguió a identificar, con ayuda del marcador de peso molecular y la información recabada de diversos autores, las subunidades proteicas respectivas de las fracciones 7S y 11S, hecho esto, cada banda fue cortada con un bisturí, después se lavaron con agua destilada para retirar el colorante y posteriormente se pulverizaron (Apéndice 2).

Con las membranas de nitrocelulosa pulverizadas que contienen las fracciones proteicas 7S y 11S obtenidas como parte del experimento 2, se inmunizaron intradérmicamente cuatro conejos (dos por cada fracción proteica) durante seis semanas en intervalos de dos semanas. Cada dos semanas se realizó un sangrado de la vena auricular previo a cada inmunización para determinar la producción de anticuerpos al evaluar su reacción contra los extractos proteicos de 7S y 11S obtenidos en el experimento 1, mediante la técnica de *Western blot*.

### ***Identificación y cuantificación de proteínas antigénicas en contenidos digestivos:***

La identificación y cuantificación de las proteínas antigénicas (glicinina y  $\beta$ -conglucininina) de pasta de soya sobre las que se produjeron los anticuerpos policlonales se hizo a través de la extracción de proteínas totales de las muestras de digestas de estómago, yeyuno e íleon de lechones alimentados con una dieta incluyendo pasta de soya al 20% a dos horas postconsumo (3 y 12 horas). Debido a que se contaba con muy poca muestra de proteínas totales extraídas de las digestas de los diferentes compartimentos, se vio la necesidad de realizar un pool de muestras del mismo órgano y de la misma hora postconsumo; además por ser muy costosa la técnica de electroforesis 2D. Por lo tanto, las 9 muestras de 3 horas postconsumo de estómago, yeyuno e íleon se juntaron teniendo solamente una muestra por cada órgano a la hora 3 postconsumo. De la misma forma se tuvo una muestra de cada órgano (menos yeyuno por no contar con suficiente muestra) a la hora 12 postconsumo.

La extracción de proteínas totales de las muestras de digestas se realizó a través de un protocolo de precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Para lo cual las muestras fueron sonicadas bajo los siguientes parámetros: 2 pulsos de 1 minuto a 70% de amplitud; posteriormente, a las muestras se les agregó ácido tricloroacético frío para una concentración final de 20% v/v y se incubó por 10 minutos a 4°C, se centrifugó a 14,000 rpm, por 5 minutos a 4°C; la pastilla se lavó dos veces con 200  $\mu$ l de acetona fría, se centrifugó con los mismos parámetros y se le agregó el amortiguador de electroforesis 2DE para la solubilización. Las proteínas fueron cuantificadas a través de un kit comercial basado en el método de Bradford con el kit Quick Start Bradford 1X Dye Reagent de Bio-Rad (Cat. 5000205). Del extracto solubilizado con el amortiguador de rehidratación 2DE (urea 7 M, tiourea 2 M, DTT 0.3% (w/v), CHAPS 2%, Tris 40 mM, inhibidor de proteasas 5 mM (w/v), 0.8% (v/v) de anfolitos en gradiente No Lineal 3-10 (pH 3-10) y bromofenol al 0.1%) se tomaron 80  $\mu$ g de proteína para hidratar tiras IPG de

7 cm con un rango de pH de 3 a 10 (ReadyStrip IPG Strips- Bio-Rad Cat. 1632000).

La SDS-PAGE 2DE fue llevada a cabo por triplicado a 80 V hasta la separación óptima, usando una cámara de electroforesis tetra (Bio-Rad). Como marcador de peso molecular se usó el estándar Precision Plus Protein Dual Color Standards de Bio-Rad (Cat. 1610374), y utilizando tiras IPG de 7 cm con un rango de pH de 3 a 10 (ReadyStrip IPG Strips- Bio-Rad Cat. 1632000). Después de la separación, las proteínas en el gel fueron teñidas con azul de Coomassie coloidal (R-250). Por otro lado, tres réplicas de los geles fueron utilizadas para hacer la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

La técnica de *Western blot 2DE*, se realizó sometiendo los geles a electrotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa en un sistema semi-seco Transblot SD (Bio-Rad) y fueron bloqueadas por incubación con leche descremada en polvo al 5 % en TBS-Tween (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.08 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 M, NaCl 0.1 M y Tween 1%) durante 16 h a 4 °C. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween y después se incubaron con los anticuerpos durante 1 h a 37 °C. Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron los que se produjeron anteriormente, lo cuales se diluyeron en TBS-Tween. Después de lavar las membranas a temperatura ambiente todas las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario IgG cabra anti-conejo (H + L) conjugado con HRP (Abcam ab97051) a una dilución 1:5000 en PBS-Tween durante 1 h a 37 °C. Las membranas se lavaron y los anticuerpos unidos se detectaron a través de una reacción de quimioluminiscencia con el sustrato ECL (Clarity™ Western ECL Substrate, BIO-RAD Cat. 170-5060). Las imágenes fueron capturadas utilizando un ChemiDoc™ MP Imaging System y fueron analizadas mediante el software PDQuest Advance (Versión 9.0.1), donde se obtuvo la cantidad relativa de proteína mediante densitometría al determinar el número de píxeles de cada punto para así obtener la intensidad por área (INT\*Área), que es la unidad arbitraria que representa la concentración de proteína. Los puntos fueron normalizados

mediante un modelo de regresión local, utilizando la cantidad cruda de cada punto en un gel, multiplicado por un factor basado en el método de regresión local del punto sobrepuesto. Esta normalización compensa la variación en los puntos, que no está relacionado a la variación en la expresión de proteínas; si no con otros factores como la diferencia en la densidad de la muestra, pipeteo y tinción.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los resultados, en el cual se hizo un análisis para encontrar diferencias en la concentración de proteína entre los grupos de acuerdo a la hora postconsumo y al órgano del cual fueron colectadas.

Las proteínas que tuvieron diferencias estadísticamente significativas fueron registradas a un nivel de confianza de 90% por grupo (Student's t-Test).

### **EXPERIMENTO 3**

Se evaluaron 14 muestras de contenidos ileales provenientes de un experimento previo, donde se emplearon 20 lechones (PIC 337 x [Landrace x Large White]), destetados a los 21 días de edad, con un peso inicial de 7.5 kg.  $\pm$  0.4 kg. Los lechones se alimentaron con cuatro dietas isoproteicas e isocalóricas a base de pasta de soya en diferentes niveles de inclusión (0, 15, 20 y 25%), libres de antibiótico (Cuadro 3) durante 7 días (NRC, 2012). Posteriormente, fueron sacrificados a los 7 días posdestete con un ayuno de 12 horas, y se obtuvieron los contenidos digestivos de íleon, los cuales fueron liofilizados y desgrasados en frío (Folch *et al.*, 1957). Cabe mencionar que no se colectó contenido de todos los lechones, ya que en 6 de ellos no se encontró contenido ileal, por lo que en total sólo se evaluaron los contenidos ileales de 14 lechones.

Las muestras de los contenidos ileales liofilizados y desgrasados se emplearon para evaluar la digestión de las subunidades de las proteínas antigénicas (glicinina y  $\beta$ -conglucina). Al igual que en el experimento 2, las muestras de contenidos se agruparon de acuerdo al porcentaje de concentración de pasta de soya de las dietas consumidas por los lechones, debido a que en algunas muestras se contó

con poca muestra, y además por ser la técnica de electroforesis 2D muy costosa: dos muestras para 0%, y cuatro muestras para cada uno de los porcentajes restantes (15%, 20% y 25%); se mezclaron las muestras respectivas de cada porcentaje para obtener un pool de cada uno; haciendo un total de muestras de cuatro (una para cada tratamiento).

**Cuadro 3.** Composición de las dietas experimentales de lechones destetados conteniendo pasta de soya a diferentes niveles de inclusión.

Ingredientes, %	Dietas experimentales			
	0%	15%	20%	25%
Maíz	53.54	53.54	53.54	53.54
Pasta de Soya	0.00	15.00	20.00	25.00
Almidón de Maíz	12.90	5.17	2.60	-
Caseína	16.96	9.43	6.93	4.43
Lactosa	12.37	12.37	12.37	12.37
Maíz, Aceite	0.67	0.67	0.67	0.67
L-Lisina HCl	0.34	0.45	0.48	0.52
L-Treonina	0.01	0.09	0.11	0.14
DL-Metionina	0.04	0.11	0.13	0.16
L-Triptofano	0.03	0.03	0.03	0.03
Sal Común	0.50	0.50	0.50	0.50
Carbonato de calcio	0.62	0.62	0.62	0.62
Fosfato Bicálcico	1.68	1.68	1.68	1.68
Minerales <sup>1</sup>	0.12	0.12	0.12	0.12
Vitaminas <sup>2</sup>	0.22	0.22	0.22	0.22

<sup>1</sup>Premezcla de minerales que aporta por Kg. de dieta: cobalto 0.72 mg, cobre 14.4 mg, hierro 120 mg, manganeso 36 mg, selenio 0.30 mg, iodo 0.96 mg, zinc 144 mg

<sup>2</sup>Premezcla de vitaminas que aporta por Kg. de dieta: vit. A 10,200 UI, vit. D 1980 UI, vit. E 60 UI, vit. K 1.2 mg, riboflavina 7.2 mg, cianocobalamina 0.04 mg, niacina 36 mg, ácido pantoténico 16.55 mg, tiamina 0.30 mg, piridoxina 0.31 mg, biotina 0.08 mg, ácido fólico 0.75 mg

La evaluación de la digestión de proteínas antigénicas (glicinina y  $\beta$ -conglucina) en el contenido ileal se realizó mediante la producción de anticuerpos contra esas proteínas como en el experimento 2 se detalló (pág. 30).

Las muestras de digesta ileal desgrasadas se procesaron para extraer las proteínas totales como previamente se describió en el experimento 2 (pág. 32); la cantidad de proteína que se usó en este experimento fue de 150  $\mu$ g para realizar las SDS-PAGE 2DE, esto para asegurar que los resultados obtenidos fueran confiables y que permitan determinar con certeza las diferencias entre las digestas analizadas. Los resultados obtenidos se representaron como intensidad por área de cada punto (INT\*Área) para expresar la concentración de proteína de cada subunidad de las proteínas antigénicas 7S y 11S.

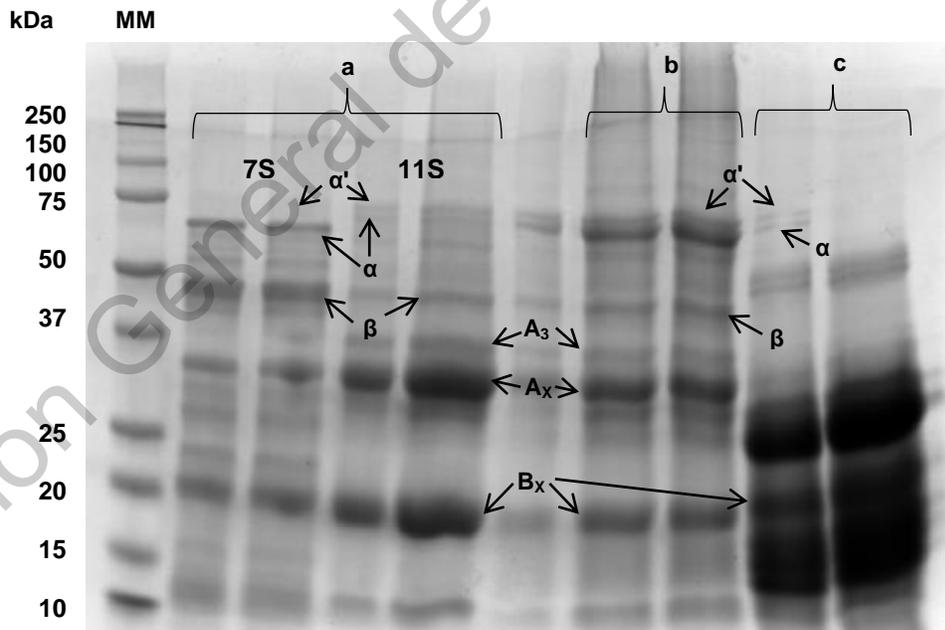
El análisis estadístico se realizó con un análisis de grupos para encontrar las diferencias en la concentración de proteína en cada grupo de acuerdo al porcentaje de inclusión de pasta de soya.

Las proteínas que tuvieron diferencias estadísticamente significativas fueron registradas a un nivel de confianza de 90% por grupo (Student's t-Test).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

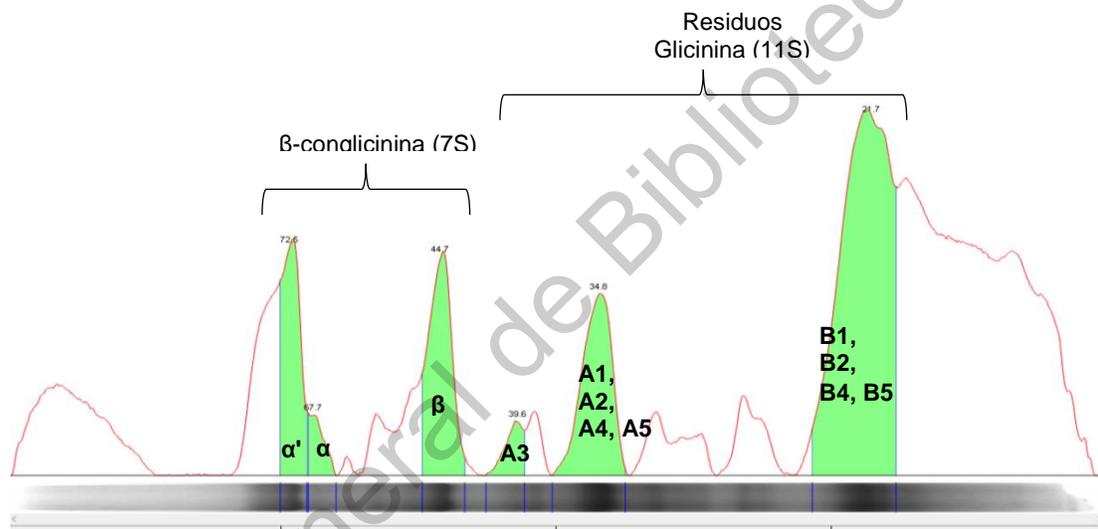
### EXPERIMENTO 1

En la Figura 2 se muestra el patrón electroforético de los extractos de proteína obtenidos a partir de las tres técnicas de extracción empleadas, o sea, utilizando el ReadyPrep 2D Cleanup Kit de Bio-Rad (Cat. 1632130), los métodos de Liu *et al.* (2007) y de Wei *et al.* (2009). En esta figura se puede observar que el rendimiento y la resolución de las proteínas obtenida a través del método de Liu *et al.* (2007) fue mayor comparado con las otras técnicas analizadas, por lo que, para los ensayos posteriores se decidió emplear este método. En los incisos b y c de la Figura 2 donde se utilizó el ReadyPrep 2D Cleanup Kit y el método de Wei *et al.* (2009), respectivamente, no hubo separación de las fracciones 7S y 11S mediante punto isoeléctrico, como en el caso del método de Liu *et al.* (2007) (Figura 2a).

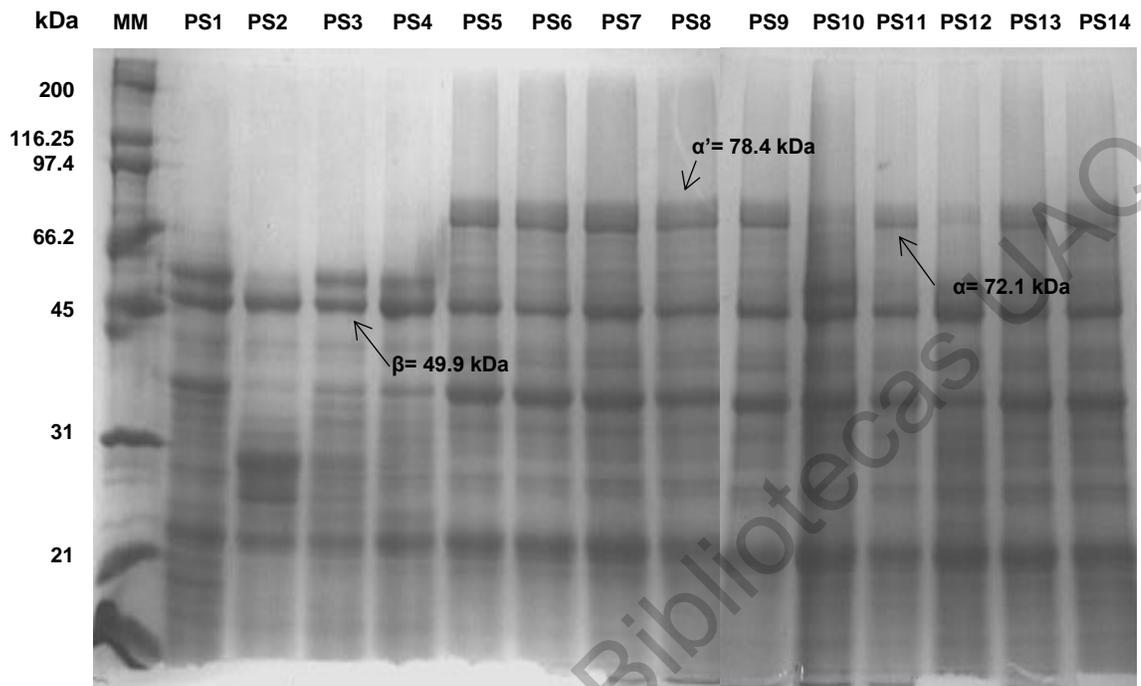


**Figura 2.** Distribución electroforética de las proteínas 11S y 7S con los métodos de extracción de **a.** Liu *et al.* (2007), **b.** ReadyPrep 2D Cleanup Kit (Cat. 1632130) y el método de **c.** Wei *et al.* (2009).

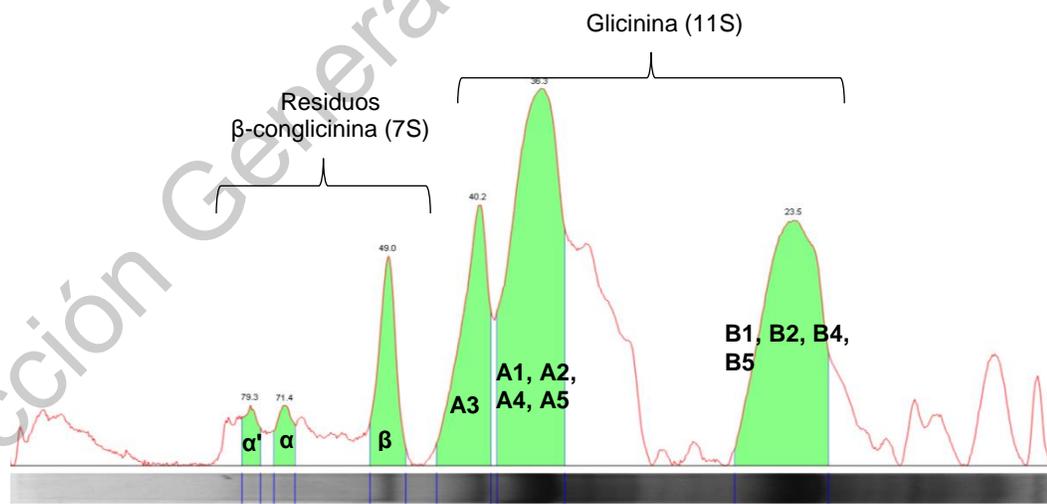
Después de realizar la extracción y llevar a cabo la separación electroforética de las fracciones proteicas de  $\beta$ -conglucina (7S) extraídas de las pastas de soya, se evidenció la presencia de residuos de subunidades de glicina (11S) (Figura 3 y Figura 4), lo cual, corrobora con lo reportado por Liu *et al.* (2007); mientras que al separar las fracciones de glicina (11S), los residuos de la fracción 7S fueron mínimos, pudiéndose apreciar mejor solo las subunidades de interés (Figura 5 y Figura 6).



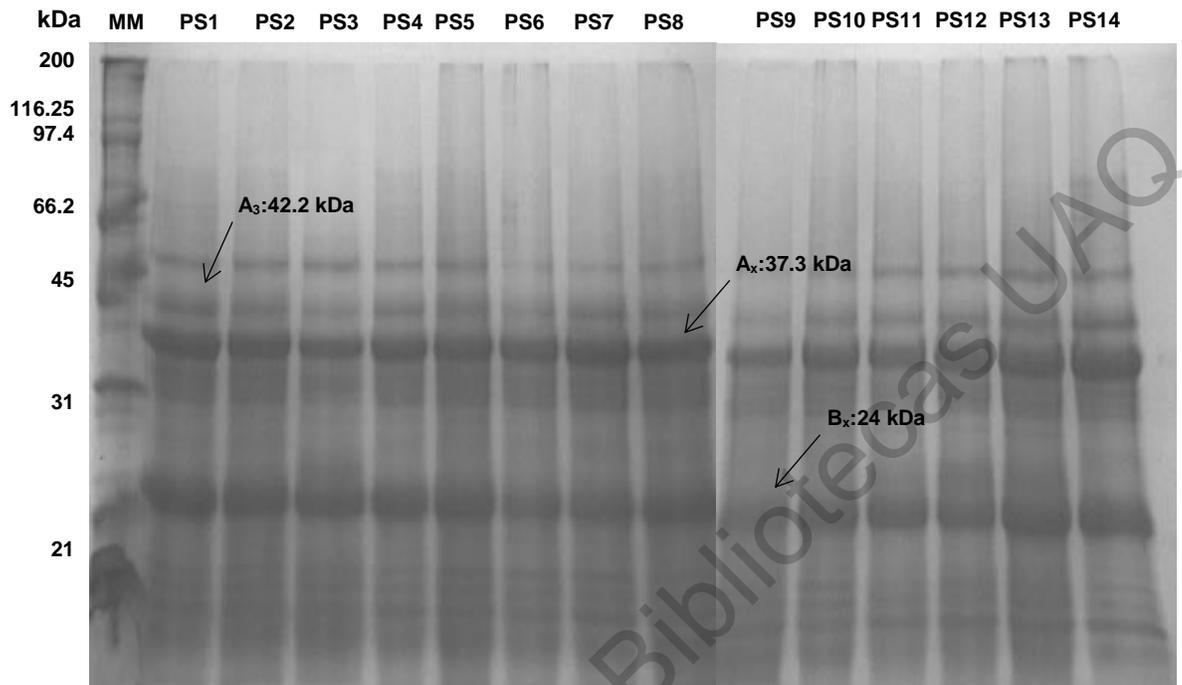
**Figura 3.** Perfil electroforético mediante SDS-PAGE de la fracción 7S ( $\beta$ -conglucina) de pasta de soya mostrando los residuos presentes de la fracción 11S (glicina).



**Figura 4.** Distribución electroforética de subunidades pertenecientes a la fracción 7S ( $\beta$ -conglucina) de las pastas de soja (PS).



**Figura 5.** Perfil electroforético mediante SDS-PAGE de la fracción 11S (glicina) de pasta de soja mostrando los residuos presentes de la fracción 7S ( $\beta$ -conglucina).



**Figura 6.** Distribución electroforética de subunidades pertenecientes a la fracción 11S (glicinina) de las pastas de soya.

La distribución electroforética de las bandas identificadas como subunidades de las fracciones 7S y 11S corresponde a lo reportado en la literatura (Krishnan y Nelson, 2011).

Las muestras de pasta de soya de la 1 a la 4 no presentaron las subunidades  $\alpha'$  y  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina (7S) (Figura 4) al realizar la separación electroforética. Esto sugiere que no fue debido a la variedad u origen de las pastas, sino a deficiencias técnicas dentro del método de extracción, ya que las mismas muestras de pasta de soya donde se observó la ausencia de dichas subunidades, al extraerles la fracción 11S y realizar la SDS-PAGE, se observó que presentaban las subunidades  $\alpha'$  y  $\alpha$  como parte de los residuos de  $\beta$ -conglucina dentro del extracto proteico de glicinina. Razón por la cual se decidió sumar las

concentraciones de las subunidades de una fracción (7S o 11S) con los residuos de la fracción homóloga encontrados en los extractos proteicos (7S o 11S).

Los pesos moleculares de las subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  correspondientes a la fracción  $\beta$ -conglucina (7S); y de las cadenas ácidas ( $A_3$  y  $A_4A_2A_{1a}A_{1b}$ ) y básicas ( $B_3$  y  $B_4B_3B_2B_{1a}B_{1b}$ ) correspondientes a la fracción glicina (11S) de las pastas de soya se muestran en el Cuadro 4. Se puede observar que en todas las subunidades de las dos fracciones proteicas alergénicas no presentaron diferencia significativa ( $P>0.05$ ) de sus pesos moleculares entre las 14 pastas de soya evaluadas.

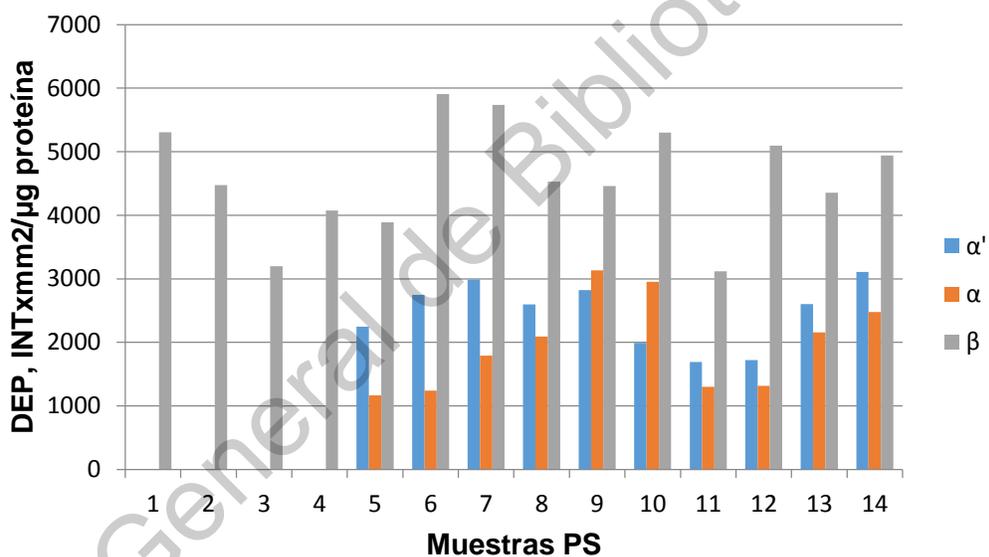
**Cuadro 4.** Masa molecular de subunidades de proteínas alergénicas  $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S).

Fracción	Subunidad	MM	P	EEM
$\beta$ -conglucina (7S)	$\alpha'$	$78.4 \pm 5.7$	NS	3.8
	$\alpha$	$72.1 \pm 5.5$	NS	2.7
	$\beta$	$49.9 \pm 4.6$	NS	0.75
Glicina (11S)	$A_3$	$42.2 \pm 2.0$	NS	0.70
	$A_4, A_2, A_{1a}, A_{1b}$	$37.3 \pm 1.4$	NS	0.26
	$B_{\text{totales}}$	$24.0 \pm 1.2$	NS	0.13

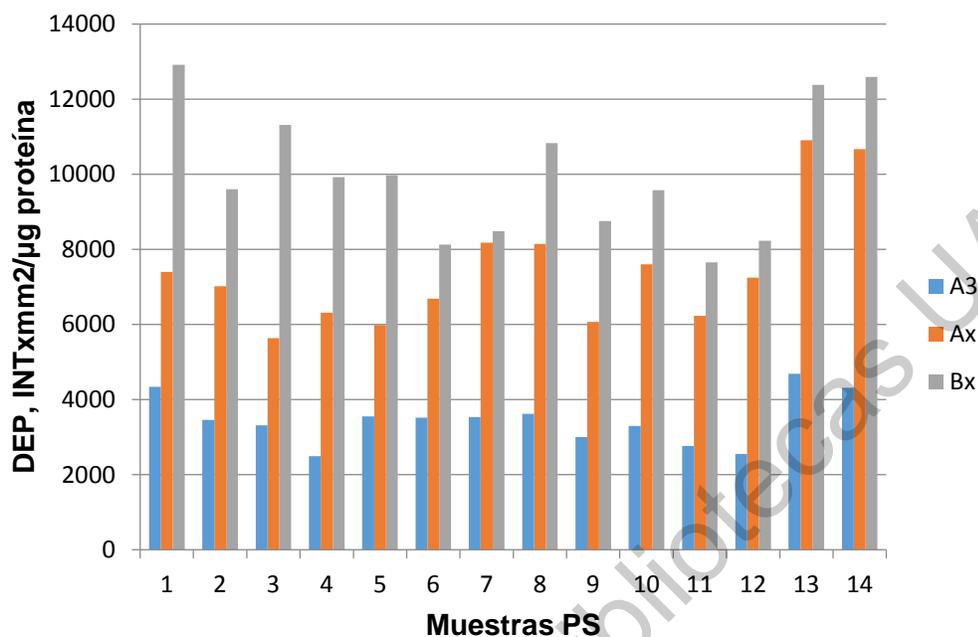
MM=Masa molecular; P=probabilidad; EEM=error estándar de la media; NS=no significativo ( $P>0.05$ )

La masa molecular para cada una de estas subunidades va de acuerdo a lo reportado por diversos autores (Krishnan y Nelson, 2011; Yang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014) respecto a la MM de estas fracciones, la cual es la siguiente:  $\alpha'$  ~72 kDa,  $\alpha$  ~68 kDa y  $\beta$  ~52 kDa correspondientes a  $\beta$ -conglucina (7S); en la cadena ácida: A 31-45 kDa y cadena básica: B 18-20 kDa correspondientes a glicina (11S). Estos resultados indican que la realización del método de extracción, de separación e identificación electroforética, así como el análisis de los geles se realizó de forma correcta, probando así su eficacia y repetitividad.

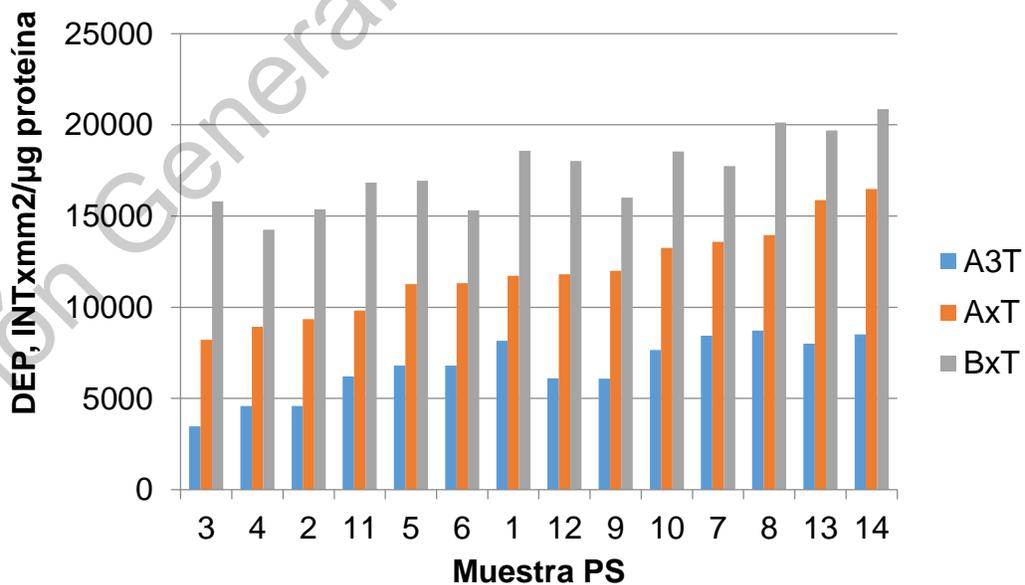
En las Figuras 7 y 8 se muestran las concentraciones de proteínas de las subunidades de la proteína 7S y 11S en muestras de pasta de soya, expresadas como densidad específica de proteínas (DEP) en unidades arbitrarias ( $\text{INTxmm}^2/\mu\text{g}$  proteína) sin sumar la concentración de las fracciones contaminantes, respectivamente. Al haberse obtenido las concentraciones de las fracciones contaminantes, estas se sumaron con sus homólogos, presentándose en las Figuras 9 y 10 para las proteínas 11S y 7S, respectivamente.



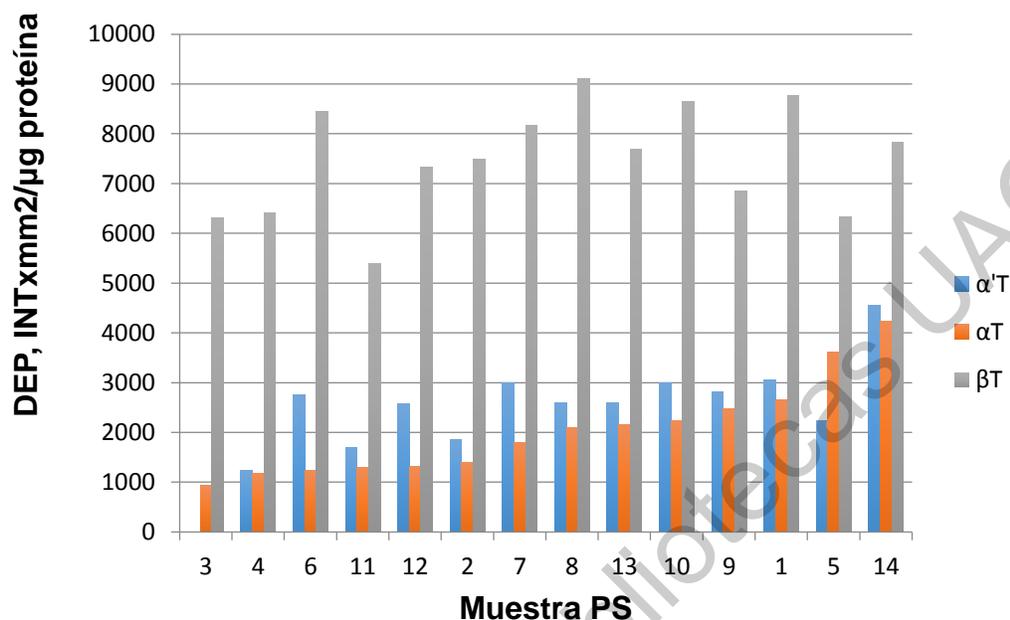
**Figura 7.** Concentración (DEP) de subunidades de la proteína 7S en muestras de pasta de soya (sin suma de fracción contaminante).



**Figura 8.** Concentración (DEP) de subunidades de la proteína 11S en muestras de pasta de soja (sin suma de fracción contaminante).



**Figura 9.** Concentración (DEP) de subunidades de la proteína 11S en muestras de pasta de soja (con suma de fracción contaminante).



**Figura 10.** Concentración (DEP) de subunidades de la proteína 7S en muestras de pasta de soya (con suma de fracción contaminante).

En las Figuras 7 a la 10 se observa, que en general las subunidades pertenecientes a la fracción 11S, tienen una mayor concentración que las subunidades de la fracción 7S.

En el Cuadro 5 se muestra la concentración promedio como densidad específica de proteínas (DEP) de las subunidades de las fracciones 7S y 11S de las 14 pastas de soya expresada en unidades arbitrarias (INTxmm2/μg de proteína), acompañada de sus parámetros descriptivos: media, mediana, moda, mínimos y máximos. En dicho cuadro se muestran los promedios y otros parámetros de las concentraciones de las subunidades ya sumadas con las concentraciones de las fracciones contaminantes, esto para apreciar de forma total la cantidad que hay de estas en las muestras. En general, las subunidades pertenecientes a la fracción 11S, tienen una mayor concentración que las subunidades de la fracción 7S. Lo anterior coincide con estudios previos en pastas de soya brasileñas (Carrão-Panizzi *et al.*, 2008; Fernandes-Galão *et al.*, 2013) en

que la concentración de la fracción 11S es mayor a la de la fracción proteica 7S. La relación de la concentración de las fracciones 11S/7S en las pastas evaluadas en el presente trabajo fue de 3.02. Kitamura y Kaizuma (1981) y Mujoo *et al.* (2003) reportan relaciones 11S/7S en pastas de soya que van de 0.95 a 3.57. El incremento de la relación de globulinas 11S/7S es deseable nutricionalmente, ya que la fracción 11S contiene mucho más metionina y cisteína que la fracción 7S, lo que significa que el valor nutritivo de las pastas de soya, en lo que al perfil de aminoácidos azufrados se refiere, es mejor (Kitamura y Kaizuma, 1981; Krishnan, 2005).

Al mejorar la calidad nutritiva de la soya se ha incrementado el contenido de la fracción 11S y ha decrecido la fracción 7S, llegando hasta tener una relación 11S/7S de 4.5 (Kaviani y Kharabian, 2008), muy superior a lo observado en el presente trabajo. El estrés ambiental durante el desarrollo de las semillas de soya puede alterar la composición química de la semilla. Cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos pueden ocurrir debido a alteraciones en las condiciones nutricionales de las plantas, particularmente en respuesta a genes y expresión de enzimas y por ende a síntesis y actividad de proteínas. También se ha indicado que la síntesis de proteínas en la soya está muy influenciada por elementos como el fósforo, potasio, nitrógeno y azufre (Kaviani y Kharabian, 2008).

Por otro lado, durante la germinación de la semilla las proteínas sufren de grandes cambios como degradación y síntesis. Algunas subunidades de las fracciones 7S y 11S se degradan durante la germinación, elongación y crecimiento de la planta. La subunidad básica de la 11S es más resistente a la degradación que la subunidad ácida, lo que se debe a diferencias estructurales entre ellas, la proteína básica es más hidrofóbica y compacta, lo que la hace propensa a formar complejos insolubles limitando el acceso al ataque proteolítico. La degradación de la fracción 7S durante la germinación es más rápida que la de la fracción 11S, sobre todo en las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$ , siendo poco degradada la subunidad  $\beta$  (Kim *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2008). Esta degradación durante la germinación de la

semilla de soya es la responsable de que exista una mayor cantidad de la fracción 11S vs 7S.

**Cuadro 5.** Concentración como densidad específica de proteínas (DEP) de subunidades de las fracciones 7S y 11S de la pasta de soya presentado como media, mediana, moda, mínimos y máximos.

Fracción	Sub- unidad	DEP (INTxmm <sup>2</sup> /μg proteína)				
		Media ± DE	Mediana	Moda	Mínimo	Máximo
β-conglicinina (7S)	α'	2427 ± 1082	2487.1	0.0	0.0	4598.1
	α	2044 ± 1028	1839.4	1134.7	0.0	4486.3
	β	7482 ± 1194	7620.7	5233.0	5233.0	9801.2
Glicinina (11S)	A <sub>3</sub>	6714 ± 1653	6710.8	3269.9	3269.9	9068.5
	A <sub>4</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>1a</sub> , A <sub>1b</sub>	11969 ± 548	11720.7	7107.3	7107.3	16599.1
	B <sub>totales</sub>	17432 ± 2084	17392.3	13626.7	13626.7	21983.0

La comparación de la concentración como densidad específica de proteínas (DEP) de las subunidades de las fracciones 7S y 11S de acuerdo con el origen de colecta de las muestras de pasta de soya: 1. AGLQ y 2. NUTEC se muestra en el Cuadro 6, donde se consideró la concentración de las fracciones con la suma de la fracción contaminante. Sólo se consideraron las muestras de la AGLQ y NUTEC debido a que para el CENID-INIFAP sólo se contaba con una muestra.

**Cuadro 6.** Concentración como densidad específica de proteínas (DEP) en unidades arbitrarias (INTxmm<sup>2</sup>/μg proteína) de las proteínas β-conglicinina (7S) y glicinina (11S) de acuerdo al origen de colecta de la pasta de soya (con suma de fracción contaminante).

Fracción	Subunidad	DEP (INTxmm <sup>2</sup> /μg proteína)		P<	EEM
		AGLQ	NUTEC		
<b>β-conglicinina (7S)</b>	α'T	1678 <sup>b</sup>	2629 <sup>a</sup>	0.0500	213
	αT	1957	1825	0.774	218
	βT	7058	7705	0.344	319
<b>Glicinina (11S)</b>	A <sub>3</sub> T	5519	7238	0.061	400
	A <sub>x</sub> T	9902 <sup>b</sup>	12697 <sup>a</sup>	0.017	484
	B <sub>x</sub> T	16184	17784	0.121	463

Como se puede observar en los resultados del Cuadro 6, la concentración de las proteínas antigénicas varió (P<0.05) de acuerdo al origen de colecta de muestra apreciándose en la subunidad α' de la β-conglicinina (7S) y en la subunidad Ax de la glicinina (11S).

El cuadro anterior muestra que las subunidades correspondientes a la fracción 11S, como previamente se mencionó, tienen una mayor concentración que las subunidades de la fracción 7S. En el análisis de la concentración de estas proteínas de acuerdo al origen de colecta de la muestra, se puede apreciar que las pastas de soya provenientes de la Asociación Ganadera Local de Querétaro, tuvieron una menor concentración de proteínas antigénicas que las muestras de NUTEC. Según Fernandes-Galão *et al.* (2013), la variación en la concentración de las subunidades de estas fracciones proteicas, pudo ser debido a ciertos mejoramientos genéticos (variedades transgénicas), que a su vez son influenciados por el ambiente y el lugar de cultivo, incluso puede darse en variedades que no han sido modificadas genéticamente. Aun no se ha determinado qué características ambientales (temperatura, precipitación, luz) son las que influyen en la concentración total de estas proteínas. Algo importante que

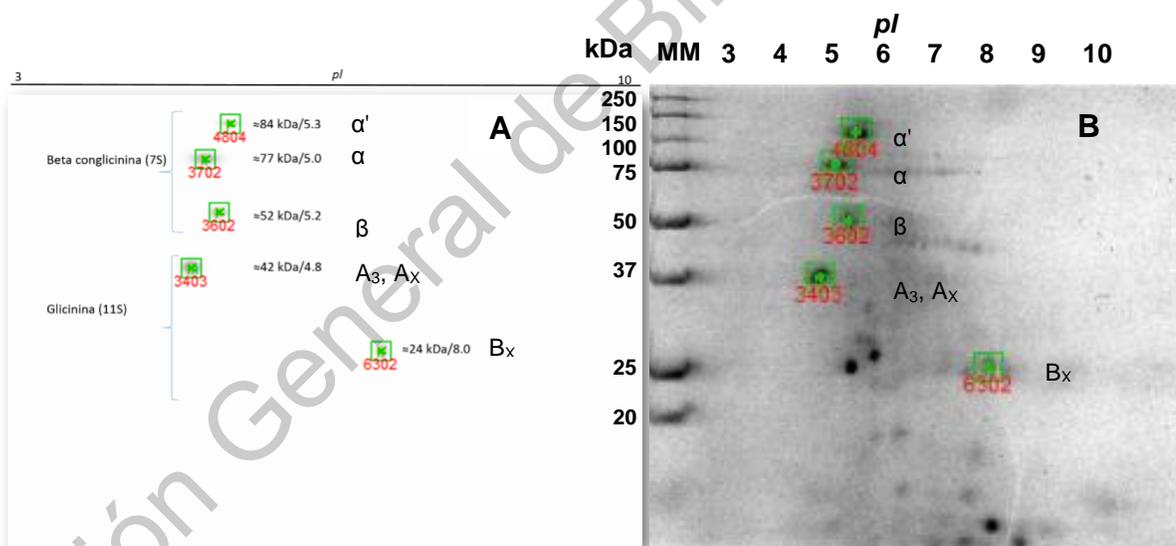
mencionan Natarajan *et al.* (2016), es que los factores ambientales influyen más en los niveles de alérgenos que la propia variación genotípica de la semilla, y concuerda con Fernandes-Galão *et al.* (2013) en que el lugar de cultivo genera más cambios en la cantidad de estas proteínas antigénicas, que la propia variedad de la semilla. Esto último se relaciona con las condiciones nutricionales del suelo en que los niveles de ciertos elementos como el fósforo, potasio, nitrógeno y azufre influyen en la síntesis de proteína en el grano de soya y por tanto afectan los niveles de estas según Kaviani y Kharabian (2008). Kim *et al.* (2011), mencionan que además de los factores ya mencionados, la concentración de las proteínas antigénicas se ven influenciados por el nivel de madurez de la semilla.

Carrão-Panizzi *et al.* (2008), reportan que es posible la manipulación genética para producir solo ciertas fracciones o subunidades, sin afectar el contenido proteico, en el caso de la nutrición animal, es el aspecto más importante.

Lo anterior es un aporte al conocimiento y una visión general de la composición proteica de la pasta de soya, lo cual al ser aplicado en la formulación de dietas para cerdos, sabiendo que la soya puede tener diferentes orígenes, y con ello variación en la cantidad y relación de sus proteínas, son aspectos a considerarse para que su impacto en la alimentación animal no resulte negativo. Aunque de acuerdo a los resultados y a lo reportado en otros estudios, la cantidad de proteína glicinina (11S) es mayor con respecto a la proteína  $\beta$ -conglucina (7S), lo cual resulta beneficioso para la nutrición animal, ya que la fracción 11S es rica en metionina y cisteína, aminoácidos esenciales para monogástricos. De igual manera, es importante recordar que la soya al ser un alimento que ha sufrido modificaciones genéticas se mantiene en evolución constante y puede tener cambios considerables en su composición, pero que a su vez pueden ser benéficos, como disminución en la cantidad de factores antinutricionales y mejoras en el perfil proteico, lo cual como ya se ha mencionado, es el aspecto más importante a la hora de formular dietas para cerdos.

## EXPERIMENTO 2

La identificación y la concentración de las proteínas antigénicas 7S y 11S en contenidos digestivos (estómago, yeyuno e íleon) colectados en diferentes tiempos de digestión (3 y 12 horas) de lechones alimentados con pasta de soya fue determinada a través de ensayos de electroforesis 2DE y *Western blot* 2DE. En la Figura 11A, se pueden observar las proteínas antigénicas que fueron reconocidas por los anticuerpos, señalados con número y mostrando la masa molecular y punto isoeléctrico (*pI* de 3 a 10) de cada una de las subunidades de la proteína  $\beta$ -conglucina (7S):  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ ; y de la proteína glicinina (11S):  $A_x$  y  $B_x$ . Así, como el patrón de proteínas obtenidas a partir del extracto total de las digestas por electroforesis 2DE, donde se señalan a las proteínas que corresponden a las que fueron reconocidas por los anticuerpos (Figura 11 B).



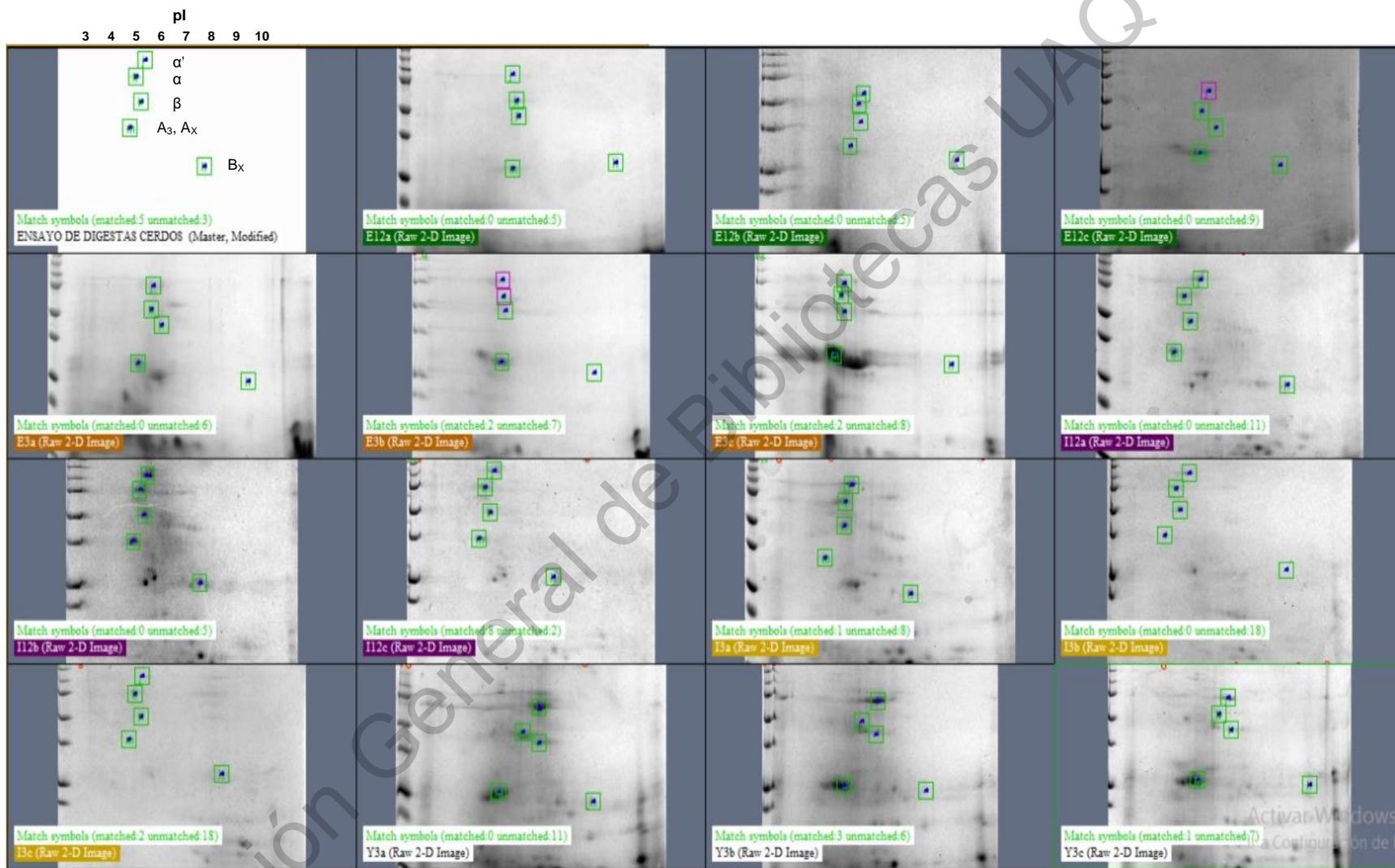
**Figura 11.** Análisis de identidad de las proteínas en digestas de estómago, íleon y yeyuno mediante electroforesis 2 DE y Western blot; en la imagen se encuentran señalados los puntos correspondientes a las subunidades de 7S y 11S. **A.** Masa molecular y *pI* de subunidades de 7S y 11S. **B.** Localización de las proteínas correspondientes a subunidades de 7S y 11S.

Los resultados muestran un patrón electroforético similar entre las muestras de digestas evaluadas a 3 y 12 horas postconsumo mediante electroforesis 2DE, en

los que la masa molecular de las fracciones 7S y 11S concuerda con la encontrada en las electroforesis 1DE realizadas en el experimento 1 en muestras de pasta de soya.

En la Figura 12 se muestra el análisis proteómico diferencial de las subunidades de las proteínas antigénicas 7S y 11S presentes en las digestas de estómago, yeyuno e íleon de lechones alimentados con pasta de soya colectadas a las 3 y 12 horas de digestión a través de una SDS-PAGE 2DE con sus respectivas réplicas (a, b y c). En dicha figura se encuentran señaladas mediante un cuadro las proteínas correspondientes a las subunidades de 7S ( $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ ) y 11S ( $A_3$ ,  $A_X$  y  $B_X$ ). En la primera imagen que se encuentra en la Figura 12, en la esquina superior izquierda, se muestra el gel maestro donde se superponen los perfiles proteicos de todos los geles analizados.

Las subunidades de las proteínas antigénicas 7S y 11S de la pasta de soya en las SDS-PAGE 2DE y *Western blot* 2DE, fueron identificadas a través del software PDQuest Advanced 2D con el marcador de punto isoelectrico 2DE (2D Electrophoresis Protein Standards con rango de  $pI$  4.45–9.6, BIO-RAD), comparado también con la masa molecular obtenida en el experimento 1; en cuanto al punto isoelectrico de cada subunidad de las proteínas 7S y 11S, este va de acuerdo a lo reportado por Wang *et al.* (2014) y Singh *et al.* (2015), el cual es el siguiente:  $pI$   $\alpha'$  5.18-5.3 ,  $pI$   $\alpha$  4.9-5.2 y  $pI$   $\beta$  5.6-6.2 correspondientes a  $\beta$ -conglucina (7S); en la cadena ácida  $pI$  A 4.2-5.5, y cadena básica  $pI$  B 6.5-8.5 correspondientes a glicina (11S). El patrón electroforético encontrado en las muestras de digestas evaluadas concuerda con lo reportado por Natarajan *et al.* (2006) en el frijol de soya (*Glycine max*) y con las masas moleculares encontradas en el experimento 1 (Cuadro 4).



**Figura 12.** Análisis proteómico diferencial de digestas a diferentes horas postconsumo a través de una SDS-PAGE 2DE. (Estómago 12 horas postconsumo [E12a,b,c; verde]; Estómago 3 horas postconsumo [E3a, b, c; naranja]. Íleon 12 horas postconsumo [I12a,b,c; morado]; Íleon 3 horas postconsumo [I3a,b,c; amarillo]. Yeyuno 3 horas postconsumo [Y3a,b,c; blanco])

En el análisis proteómico se determinó la concentración de proteína representada como intensidad por área de cada punto (INT\*Área) de cada subunidad de las proteínas antigénicas 7S y 11S de la pasta de soya. Los resultados revelaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.1$ ) en la concentración de proteínas antigénicas entre las digestas de estómago, yeyuno e íleon a las 3 y 12 horas postconsumo, este resultado podría estar influenciado por el número de muestras analizadas, ya que para estos ensayos se utilizaron 12 muestras; el aumentar la cantidad de muestras a analizar permitiría visualizar un efecto más cercano a la realidad, ya que eliminaría fluctuaciones marcadas en los resultados. Adicionalmente, encontramos mucha variabilidad en los datos, lo que corresponde con la variabilidad intrínseca a los sistemas biológicos experimentales; esto a pesar de que el análisis se realizó con el software PDQuest para normalizar cada experimento.

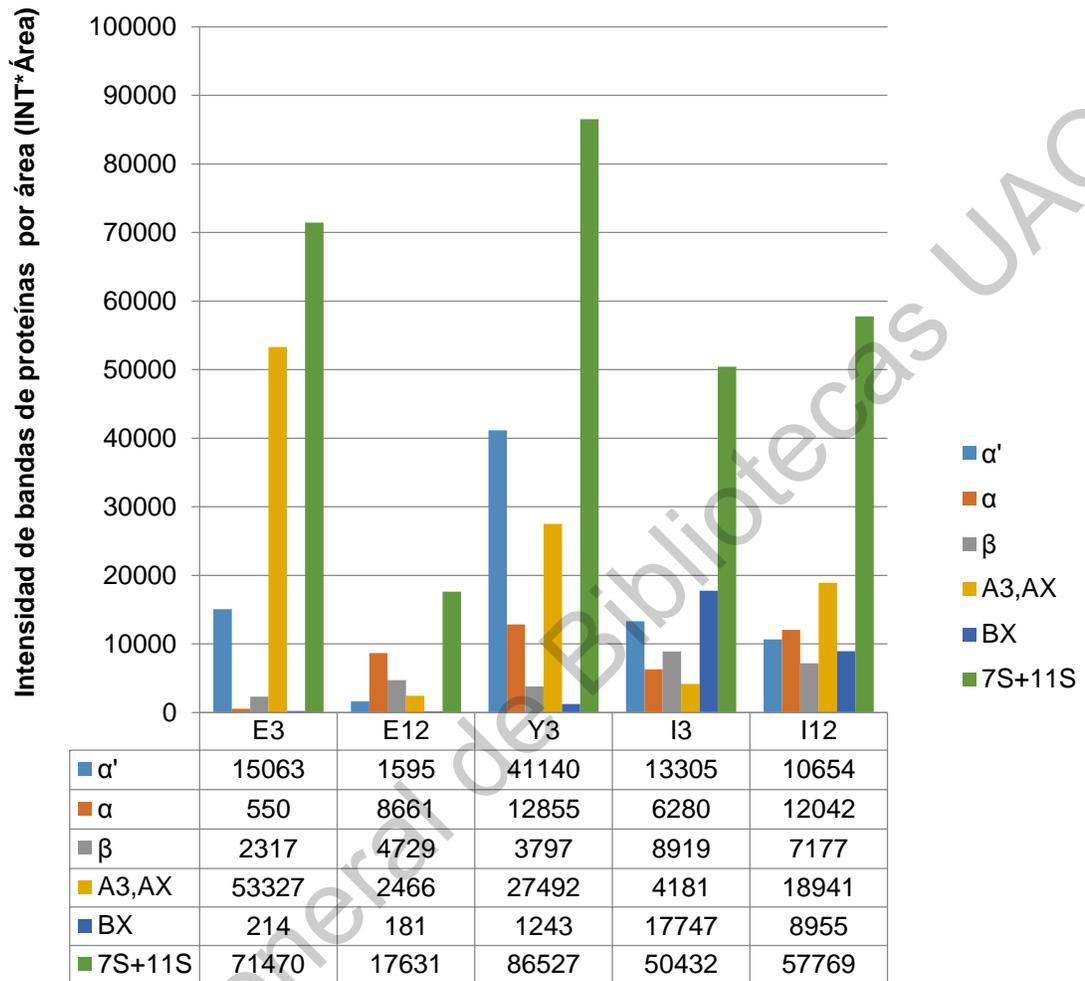
Sin embargo, en las muestras de íleon se observaron diferencias evidentes en la concentración de proteínas antigénicas 7S y 11S, siendo mayor a las 12 horas postconsumo. En la Figura 13, se encuentran desplegadas las medias de la concentración de proteína (INT\*Área) de las subunidades de cada fracción proteica, por órgano y hora. En dicha figura se aprecia de manera general que la concentración de proteínas antigénicas tiende a aumentar conforme la digesta transita del estómago hacia el intestino delgado (yeyuno e íleon), principalmente en el yeyuno a las 3 horas de digestión, a excepción de la subunidad  $\alpha'$  de la fracción 7S.

Al sumar la concentración de proteína de las subunidades de ambas fracciones (7S+11S) por órgano y hora se obtuvieron los siguientes resultados: estómago 3 y 12 horas 71470 y 17631 INT\*Área, respectivamente; yeyuno 3 horas 86527 INT\*Área; íleon 3 y 12 horas 50432 y 57769 INT\*Área. Con estos resultados se pueden apreciar los cambios en la concentración de proteína total conforme la digesta avanza a través del tracto gastrointestinal permitiendo ver que en el estómago disminuye a las 12 horas postconsumo, aumentando al llegar al

yeyuno a las 3 horas postconsumo, y conforme avanza al íleon a las 3 horas postconsumo la concentración de proteína disminuye relativamente, ya que a las 12 horas postconsumo en el íleon, esta vuelve a incrementar. Lo anterior va de acuerdo a los planteamientos iniciales, ya que se esperaba encontrar una mayor concentración de las proteínas antigénicas de la soya en la parte final del tracto gastrointestinal, que en este caso se trata del íleon.

***Digestión en el estómago, yeyuno e íleon de las subunidades de la fracción 7S de la pasta de soya en lechones destetados.***

En el caso de la subunidad  $\alpha'$ , su concentración disminuye en estómago (89.4%) y en íleon (20%) de las 3 a las 12 horas por efecto de digestión y tránsito. El 74% desaparece del yeyuno de las 3 horas al íleon a las 12 horas por digestión enzimática de proteasas pancreáticas e intestinales y por tránsito, permaneciendo en íleon a las 12 horas un remanente sin digerir del 26% de dicha subunidad. Estos porcentajes sugieren que la subunidad  $\alpha'$  de la fracción 7S de la pasta de soya es altamente digerida por la pepsina, proteasas pancreáticas e intestinales de lechones destetados, lo cual concuerda con lo reportado por Yang *et al.* (2016).



**Digestas de estómago (E3, E12), yeyuno (Y3) e íleon (I3, I12) a diferentes horas postconsumo (3 y 12 horas)**

**Figura 13.** Concentración de proteína (INT\*Área) en digestas de estómago, yeyuno e íleon a diferentes horas postconsumo: 3 y 12 horas. \*7S+11S: Concentración total de subunidades de las fracciones de 7S y 11S por órgano y hora.

La concentración de la subunidad  $\alpha$  se incrementó en el estómago de las 3 a las 12 horas de digestión. Esto se refleja en una alta concentración de esta subunidad en el yeyuno a las 3 horas y hasta en el íleon a las 12 horas de digestión. Lo anterior indica una deficiente digestión de la subunidad  $\alpha$  de la fracción 7S de la pasta de soya por la pepsina, proteasas pancreáticas e intestinales de lechones destetados, lo que confirma los reportes de esta resistencia en estudios realizados *in vitro* (Fu *et al.*, 2007).

La concentración de la subunidad  $\beta$  se incrementó en el estómago de las 3 a las 12 horas de digestión, indicando una escasa digestión por parte de la pepsina. La digestión de la subunidad  $\beta$  en el intestino delgado por proteínas pancreáticas e intestinales fue muy baja, ya que en el íleon a las 12 horas se encontró una alta concentración de la subunidad. Indicando una deficiente digestión de la subunidad  $\beta$  de la fracción 7S de la pasta de soya por la pepsina, proteasas pancreáticas e intestinales de lechones destetados (Yang *et al.*, 2016). Moreno (2007), Wang *et al.* (2009) y Huang *et al.* (2015), reportan extrema estabilidad digestiva de esta subunidad a lo largo del tracto gastrointestinal, detectándola todavía en yeyuno e íleon.

***Digestión en el estómago, yeyuno e íleon de las subunidades de la fracción 11S de la pasta de soya en lechones destetados.***

La concentración de las subunidades ácidas ( $A_3$ ,  $A_X$ ) en el estómago de lechones se vio altamente disminuida (95.4%) de las 3 a las 12 horas por la digestión por pepsina y tránsito al intestino delgado. A las 3 horas postconsumo las subunidades ácidas en yeyuno desaparecieron un 48.4% con respecto a las observadas en el estómago a las 3 horas, lo que indica que este porcentaje de proteína fue digerido las primeras 3 horas postconsumo por la pepsina y las proteínas pancreáticas e intestinales. Del yeyuno a las 3 horas al íleon a las 12 horas postconsumo las subunidades ácidas desaparecieron en un 31.1% por digestión de proteasas pancreáticas e intestinales y por tránsito. Del estómago a

las 3 horas al íleon a las 12 horas desaparecieron las subunidades ácidas en un 64.5%, lo que indica una mediana digestión. En estudios *in vitro* se observó que las cadenas ácidas (A) de glicinina no fueron hidrolizadas efectivamente con pepsina (Yang *et al.*, 2016), a pesar de lo anterior, su grado de degradación es relativamente mayor al observado en las subunidades básicas (B).

Las subunidades básicas (B<sub>x</sub>) muestran un aumento en su concentración conforme avanza a través del tracto gastrointestinal hasta llegar al íleon, lo que indica baja degradación enzimática, tanto de la pepsina gástrica, como de las proteasas pancreáticas e intestinales. Lo anterior puede ser debido a la estructura propia de esta subunidad, ya que posee mayor cantidad de enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro intra e intermoleculares, lo que le confiere una mayor compactación y una menor accesibilidad al ataque proteolítico (Kim *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). Yang *et al.* (2016), reportan una degradación más lenta de las cadenas básicas (B) que de las cadenas ácidas (A) de glicinina.

En general en lo referente al estómago, se observa el cambio en la concentración de proteína, ya que a las 3 horas postconsumo la concentración es mayor que a las 12 horas, esto debido al vaciado gástrico que va de 3 a 5 horas (Wang *et al.*, 2010), por lo que es evidente, que a las 12 horas postconsumo, la concentración de estas proteínas es mucho menor. Aunque según Zhao *et al.* (2008), las proteínas alergénicas de la soya se empiezan a digerir de forma limitada en el estómago, pudiendo disminuir hasta en un 50% su concentración inicial, lo cual puede observarse en las subunidades  $\alpha'$  (7S) y A<sub>3</sub>, A<sub>x</sub> (11S), que disminuyeron su concentración hasta en un 89.4% y 95.4%, respectivamente, que bien puede ser atribuido al tiempo de vaciado gástrico, ya que la actividad de la pepsina se encuentra limitada por la escasez de ácido clorhídrico, generando poca digestión en dichas proteínas (Wang *et al.*, 2010).

Como ya se mencionó anteriormente, el análisis proteómico diferencial de las proteínas antigénicas de la pasta de soya entre las digestas de estómago,

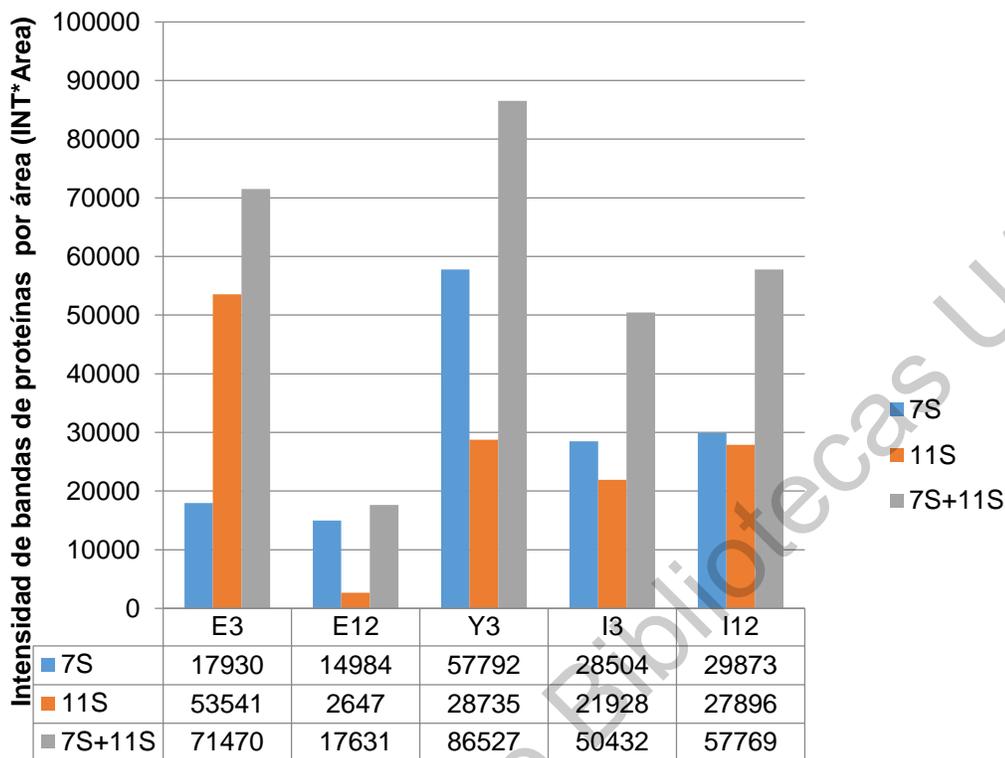
yeyuno e íleon a las 3 y 12 horas postconsumo no mostraron diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, se encontraron diferencias evidentes en la concentración de proteína entre los grupos yeyuno 3 horas e íleon 3 horas, observándose mayor concentración aparente en el yeyuno, excepto en la subunidad  $\beta$  (7S) y  $B_x$  (11S), las cuales tuvieron mayor concentración en el íleon a las 3 horas postconsumo; así como entre íleon 3 horas e íleon 12 horas, donde las subunidades  $\alpha'$  y  $\beta$  de  $\beta$ -conglucina, y la subunidad  $B_x$  de glicina, tuvieron mayor concentración de proteína en el íleon a las 3 horas; y las subunidades  $\alpha$  ( $\beta$ -conglucina) y  $A_3$ ,  $A_x$  (glicina), tuvieron mayor concentración en el íleon a las 12 horas postconsumo.

En lo referente al aumento en la concentración de estas proteínas en yeyuno e íleon, concuerda con lo reportado por Wang *et al.* (2009), donde mencionan que la proteína  $\beta$ -conglucina (7S) aún es detectada en estas porciones del intestino delgado, lo cual puede observarse en la Figura 19, donde se puede apreciar que la concentración proteica de la fracción 7S es mayor que la de 11S, tanto en yeyuno como en íleon, lo que implica un incremento en la posibilidad de que el cerdo desarrolle una reacción alérgica contra dicha proteína. La concentración en yeyuno de estas proteínas, mucho tiene que ver con el tiempo de vaciado gástrico que va de 3 a 5 horas, y a la deficiente actividad de la pepsina que ya se ha mencionado anteriormente, lo que genera una mayor concentración tanto de 7S como de 11S en las porciones iniciales del intestino delgado, donde se encuentra el yeyuno (Wang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2013).

Aunque la concentración de 11S no es mayor a la de 7S, su estabilidad en las últimas porciones del intestino delgado, es indicativo de su resistencia a la proteólisis, al menos de la cadena básica ( $B_x$ ) de glicina que es más resistente a la hidrólisis con tripsina atribuido a su estructura compacta debido a su naturaleza hidrofóbica (Zhao *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011).

En el análisis de la concentración de proteína de las subunidades pertenecientes a  $\beta$ -conglucina (7S), de acuerdo con Amigo-Benavent *et al.*

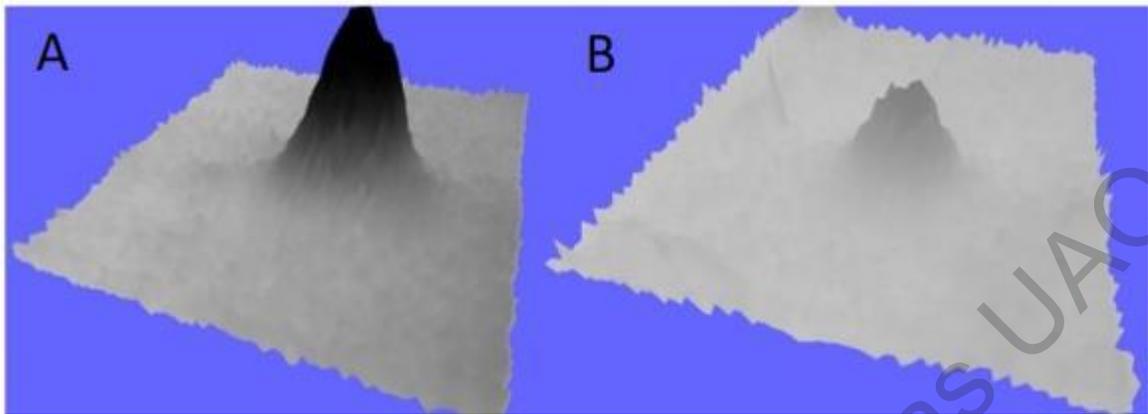
(2011), mencionan que en general los polipéptidos de esta proteína son resistentes a la digestión y pueden sobrevivir al tránsito a través del estómago y el intestino delgado, esto lo podemos constatar con los datos reportados en la Figura 14, donde se aprecia que la fracción 7S ( $\beta$ -conglucina), aunque su concentración fue menor en el estómago a las 3 horas postconsumo, fue aumentando gradualmente conforme avanzaba a través del tracto gastrointestinal, y al llegar al yeyuno e íleon, el concentración proteica se incrementó notoriamente en comparación con la concentración de proteína de la fracción 11S (glicina). Esto también fue reportado por Zhao *et al.* (2008), que mencionan que glicina fue degradada más fácilmente que  $\beta$ -conglucina, la cual aún fue detectada incluso antes de llegar al colon, donde desapareció. Debido a lo anterior, es importante mencionar que la posible causa de la permanencia de  $\beta$ -conglucina en el tracto gastrointestinal es su estructura, ya que esta se encuentra glicosilada; de acuerdo con investigaciones previas, esto le confiere resistencia a la proteólisis, al menos para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , ya que la subunidad  $\alpha'$  fue más susceptible a la digestión (Amigo-Benavent *et al.*, 2011).



**Digestas de estómago (E3, E12), yeyuno (Y3) e íleon (I3, I12) a diferentes horas postconsumo (3 y 12 horas)**

**Figura 14.** Concentración total de las proteínas  $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S) (INT\*Área) en digestas de estómago, yeyuno e íleon a diferentes horas postconsumo: 3 y 12 horas.

Se hizo una comparación representativa en 3D de la concentración de proteína del punto identificado como 3404 en los geles que corresponde a la subunidad A<sub>3</sub> de glicina (42 kDa/pl 4.8) (Figura 15) como un ejemplo para observar la marcada diferencia en la concentración de proteína que existe entre la muestra de digesta del íleon a las 3 y a las 12 horas postconsumo, donde se observó una mayor concentración de proteína en íleon a las 12 horas.



**Figura 15.** Comparación representativa en 3D de la concentración de proteína glicinina A3:  $\approx 42$  kDa/pl 4.8, en muestras de digestas de íleon, usando anticuerpos policlonales. **A.** Íleon 12 horas postconsumo. **B.** Íleon 3 horas postconsumo. Factor de la escala: 0.003; a través de 3D viewer.

Además de las características mencionadas que confieren resistencia y estabilidad a la digestión de las proteínas glicinina y  $\beta$ -conglucina, otros factores importantes que influyen en lo anterior son los dependientes del animal, que son la edad del cerdo y por tanto, su madurez gastrointestinal, de acuerdo con investigaciones hechas por Wang *et al.* (2009; 2010) y Zhao *et al.* (2013), donde se evaluó la disminución de la inmunoreactividad y distribución en el tracto gastrointestinal de estas proteínas alergénicas en cerdos a diferentes edades: lechones, cerdos en crecimiento y cerdos en finalización; concluyeron que a medida que aumenta la edad del cerdo, disminuye la distribución gastrointestinal de glicinina y disminuye la inmunoreactividad de 7S y 11S, cosa que en lechones, debido a la inmadurez gastrointestinal, hay poca actividad de tripsina y quimotripsina, lo que por consiguiente, genera una digestión deficiente de dichas proteínas (Hartman *et al.*, 1961; Efirid *et al.*, 1982), aunado además al estrés debido al destete y todas las problemáticas que conlleva este en el desarrollo del cerdo.

Por lo tanto, el aumento en la concentración de proteína en las últimas porciones del intestino delgado, son debido a las características propias de las proteínas antigénicas como son su resistencia y estabilidad a la digestión; y a

causas dependientes de los animales como la inmadurez gastrointestinal y el estrés debido al destete. Conforme avanza el proceso de digestión y el tiempo que permanecen estas proteínas a través del tracto gastrointestinal, al ser poco digeridas en estómago, su concentración aumenta a las 12 horas y en las últimas porciones del intestino delgado, que es yeyuno e íleon, siendo más notorio en la proteína  $\beta$ -conglucina (7S), lo que permite concluir que la proteína glicina (11S) se digiere más fácilmente.

Los resultados anteriores muestran la permanencia en la última parte del intestino delgado y resistencia a la digestión de la proteína  $\beta$ -conglucina (7S), específicamente las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , incluyendo a las cadenas básicas (B) de glicina (11S). Aunque ambas proteínas antigénicas son resistentes a la digestión y pueden generar reacción alérgica, la proteína  $\beta$ -conglucina (7S) es la que muestra un mayor efecto. Dicho efecto no se limita a la baja digestibilidad de estas proteínas, sino también a los cambios que pueden generar en el organismo del lechón, y que se pueden reflejar en poca ganancia de peso, bajo consumo de alimento, disminución en la absorción de nutrientes, atrofia de vellosidades intestinales y diarreas (Wu *et al.*, 2016b). Entre los cambios a nivel intestinal provocados por ambas proteínas está el aumento en los mastocitos intestinales activados por anticuerpos IgE específicos, lo que resulta en la liberación de histamina y citocinas, y por consiguiente en la inflamación de la mucosa intestinal (Zhao *et al.*, 2013). En un estudio hecho por Wu *et al.* (2016a), en lechones en los que se evaluó el efecto de las proteínas antigénicas de la soya sobre la mucosa intestinal, se encontró que las células enterocromafines, que son las responsables de los estímulos que activan los reflejos secretorios, peristálticos y de contracción a través de la secreción de serotonina, son dañadas a causa de la reacción alérgica en contra de glicina y  $\beta$ -conglucina, generando aumento en la secreción de este neurotransmisor, lo que incrementará la peristalsis intestinal contribuyendo a causar diarrea. Se encontró también que existe un aumento en la liberación de diaminoxidasa, enzima responsable de degradar la histamina, lo

cual fue más evidente en pruebas hechas con  $\beta$ -conglucina que con glicina, lo que indica que la fracción 7S genera una respuesta inflamatoria mayor debido a su inmunoreactividad, lo cual también se relaciona con su resistencia a la digestión. Además provoca un aumento en la distribución y expresión de IgA en duodeno, yeyuno e íleon distal. En general, el daño a la mucosa fue mayor por parte de  $\beta$ -conglucina que de glicina. En otros estudios, se determinó que la proteína glicina puede ser absorbida a través de las células epiteliales intestinales y estimular la producción de IgG en suero, lo que genera una respuesta inmune sistémica importante, además de la respuesta local ya mencionada (Sun *et al.*, 2008). En general, estos son los efectos que las proteínas glicina y  $\beta$ -conglucina tienen en el organismo del lechón, y que como se puede determinar, generan gran daño en el tracto gastrointestinal que incluso puede llevar a la muerte del animal, además de que esto también se traduce en pérdidas económicas para la unidad de producción.

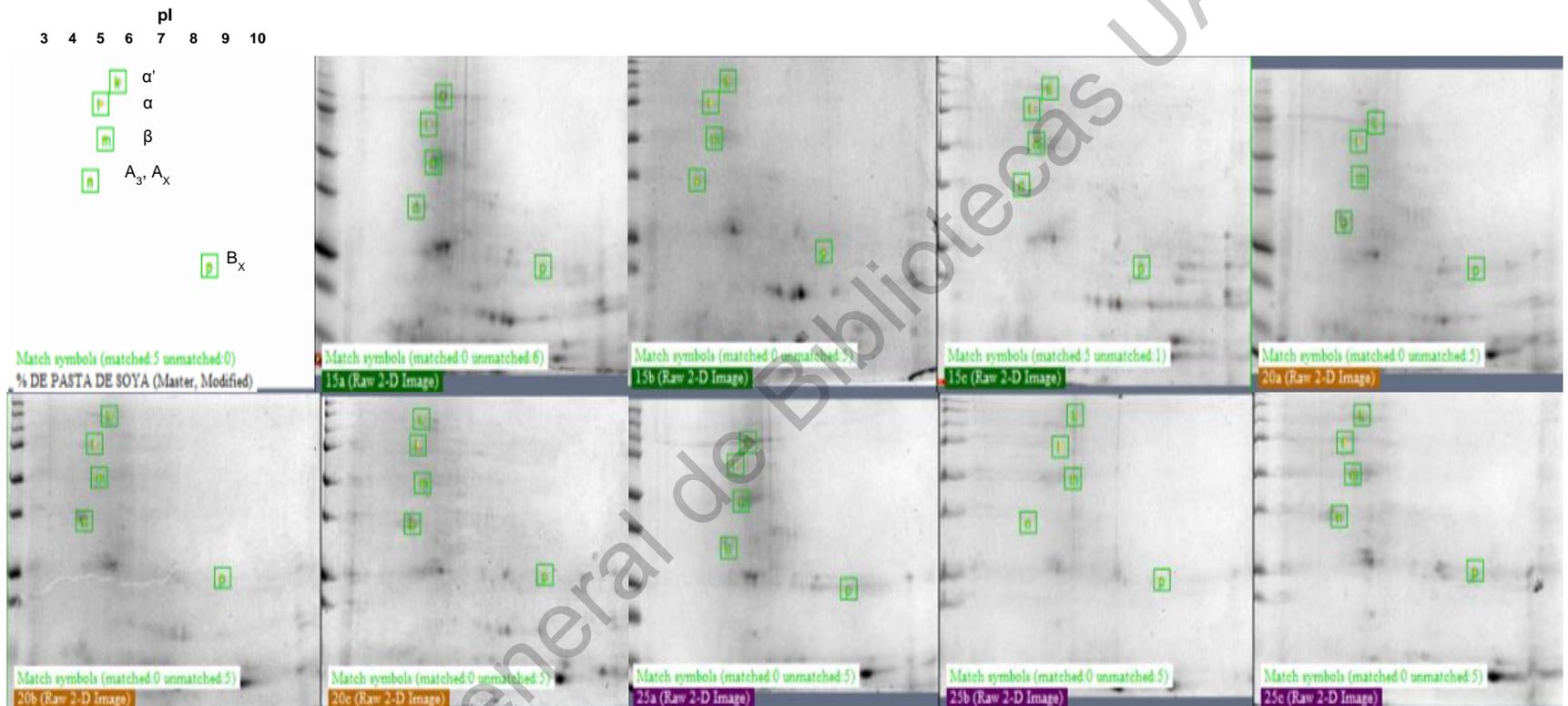
### EXPERIMENTO 3

La identificación y la concentración de las proteínas antigénicas  $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S) en contenidos ileales de lechones alimentados con dietas con diferente concentración de pasta de soya (0%, 15%, 20% y 25%) fue determinada a través de ensayos de electroforesis 2DE y *Western blot* 2DE. Se realizaron tres réplicas de cada muestra de digesta por concentración de pasta de soya: 0%, 15%, 20% y 25%.

Para descartar que los anticuerpos anti- glicina y anti- $\beta$ -conglucina utilizados en este trabajo, reconocieran componentes de las dietas que consumieron los cerdos se realizó un análisis bioinformático de alineamiento de secuencias a través de un BLAST en el servidor de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra la base de datos de maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*) y con todos los proteomas registrados que pudieran

estar interfiriendo en el reconocimiento y no se encontraron similitudes de identidad. Lo que significa que dichos anticuerpos solo reconocieron a las proteínas antigénicas de la soya, y no proteínas que forman parte de otros ingredientes de la dieta.

En la Figura 16 se muestra el análisis proteómico diferencial de las subunidades de las proteínas antigénicas 7S y 11S (señaladas mediante un cuadro) presentes en los contenidos ileales de lechones destetados con diferentes concentraciones de pasta de soya a través de una SDS-PAGE 2DE con sus respectivas réplicas (a, b y c): verde 15%, amarillo 20%, morado 25%. En el análisis de las muestras con 0% de pasta de soya no se detectaron las subunidades de las fracciones 7S y 11S, por lo que los resultados de dicho análisis no se muestran.



**Figura 16.** Análisis proteómico diferencial de digestas ileales con diferente concentración de pasta de soya en la dieta a través de una SDS-PAGE 2DE (concentración de 15% [verde 15a, b, c]; concentración 20% [amarillo 20a, b, c]; concentración de 25% [morado 25a, b, c]).

Los resultados demuestran un patrón electroforético similar entre las muestras de digestas analizadas, en los que la masa molecular de las fracciones 7S y 11S, al igual que en el experimento 2, concuerda con la encontrada en las electroforesis 1DE realizadas en el experimento 1 en muestras de pasta de soya. Como ya se mencionó anteriormente, se realizó el mismo procesamiento y análisis de las muestras con 0% de inclusión de pasta de soya, y no se detectaron las subunidades de las proteínas  $\beta$ -conglucina y glicina, lo cual era de esperarse ya que era una dieta libre de pasta de soya.

Al tratarse de la identificación de las mismas proteínas antigénicas que en el experimento 2, las subunidades de las proteínas 7S y 11S de la pasta de soya en las SDS-PAGE 2DE y *Western blot* 2DE, fueron identificadas a través del software PDQuest Advanced 2D con el marcador de punto isoelectrico 2DE (2D Electrophoresis Protein Standards con rango de pI 4.45–9.6, BIO-RAD), y al igual que en el experimento 2, fue comparado también con la masa molecular obtenida en el experimento 1. El punto isoelectrico de cada subunidad de las proteínas 7S y 11S, va de acuerdo a lo reportado por Wang *et al.* (2014) y Singh *et al.* (2015), el cual es el siguiente: pI  $\alpha'$  5.18-5.3 , pI  $\alpha$  4.9-5.2 y pI  $\beta$  5.6-6.2 correspondientes a  $\beta$ -conglucina (7S); en la cadena ácida pI A 4.2-5.5, y cadena básica pI B 6.5-8.5 correspondientes a glicina (11S). El patrón electroforético encontrado en las muestras de digestas evaluadas concuerda con los patrones electroforéticos reportados por Natarajan *et al.* (2006) en el frijol de soya (*Glycine max*) y con las masas moleculares encontradas en el experimento 1 (Cuadro 4) y 2 (Figura 11).

En el análisis proteómico de este experimento, al igual que en el experimento 2 se determinó la concentración de proteína representada como intensidad por área de cada punto (INT\*Área) de cada subunidad de las proteínas antigénicas  $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S).

Al obtenerse las concentraciones totales (7S+11S) de las proteínas  $\beta$ -conglucina y glicina en el contenido ileal de los lechones alimentados con dietas

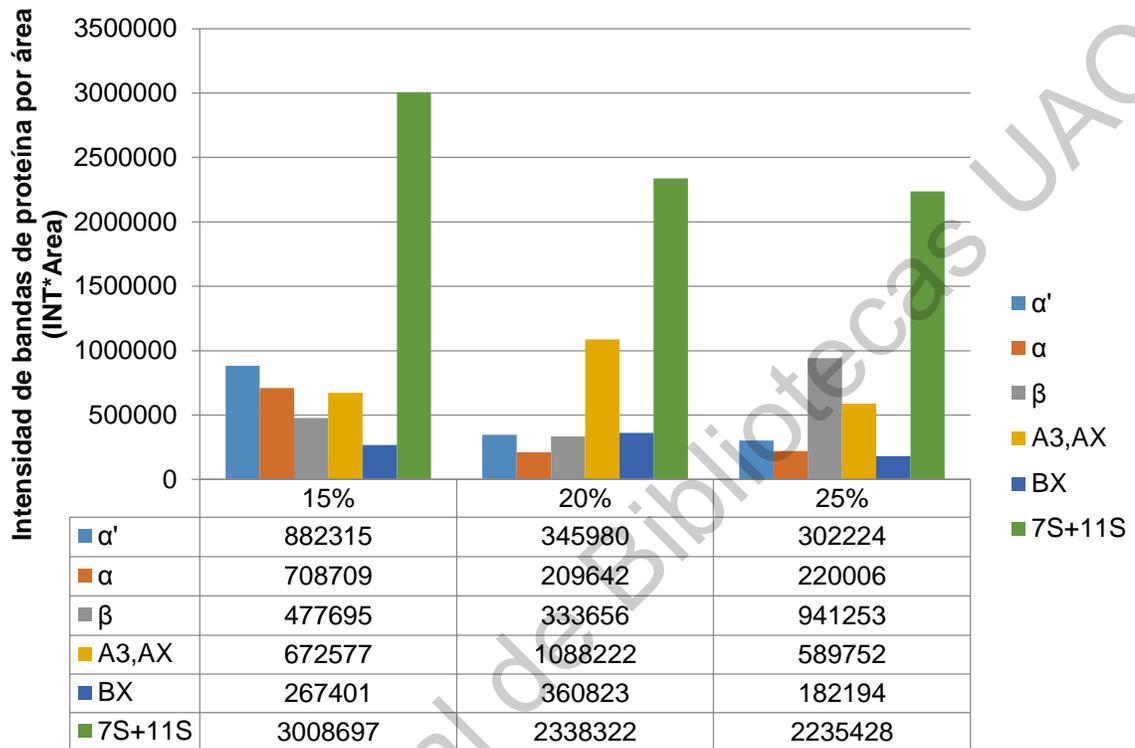
con diferentes niveles de inclusión de pasta de soya (Figura 17): 3,008,697 INT\*Área (15%), 2,338,322 INT\*Área (20%) y 2,235,428 INT\*Área (25%), se puede observar que la concentración de proteína en la digesta de los animales que consumieron la dieta con 15% de pasta de soya es mayor a las muestras con 20 y 25%, ya que en estas la concentración de proteína va disminuyendo de forma escalonada a pesar de tener una mayor ingestión de pasta de soya.

Se esperaba que a mayor cantidad de pasta de soya en la dieta, y por tanto mayor concentración de proteínas antigénicas en esta, en la parte final del intestino delgado, se encontraría una mayor concentración de estas proteínas correspondiente al porcentaje de inclusión (0%, 15%, 20% y 25%). O sea, las concentraciones de proteína resultantes debían observarse de manera escalonada en aumento, y no como realmente resultaron, en que la concentración más alta de pasta de soya (25%), tiene la menor concentración de proteínas 7S y 11S, que las muestras con 15% pasta de soya, las cuales tienen la mayor concentración de dichas proteínas. El consumo diario de alimento registrado en este experimento no mostró diferencias ( $P>0.05$ ) entre las dietas con diferentes niveles de pasta de soya (143, 137, 117 y 155 g/d para las dietas con 0%, 15%, 20% y 25%, respectivamente). Ajustando las concentraciones de proteínas antigénicas en relación al consumo diario de alimento se obtienen: 21,961.3, 19,985.7 y 14,422.1 INT\*Área/g consumido, respectivamente a 15, 20 y 25% de inclusión de pasta de soya (Reis de Souza, 2017). Estos valores se comportan de la misma manera que los de las concentraciones de proteínas antigénicas en el contenido ileal, ya que el CDA no mostró diferencias entre las dietas. Por otro lado, Reis de Souza (2017) reportó en estas dietas una alta incidencia de diarrea, 4 y 5 días durante la semana experimental; y el Índice de Severidad de Diarreas fue bajo, hubo Diarrea Ligera Pastosa (ISD= 1) en todas las dietas, incluida la dieta con 0% de pasta de soya.

Es posible que estos resultados sean debido a que este experimento se realizó *in vivo*, por lo que en él interfieren factores propios del organismo de cada

animal que no son posibles de controlar y generan variaciones que resultan en datos distintos a los esperados, e incluso pudo ser debido a errores técnicos en el procesamiento de las muestras, ya que estas fueron procesadas en forma de pool, y no de manera individual. Es importante mencionar, que en general las concentraciones de proteína obtenidos en el experimento 3, son mayores que los obtenidos en el experimento 2, lo cual puede ser explicado por la diferencia de edades entre los lechones del experimento 2 y 3, es decir, los animales del experimento 3 se sacrificaron a los 28 días de edad en comparación con los del experimento 2, en que estos tenían ya 35 días de edad, lo que puede significar que el grado de madurez gastrointestinal a los 28 días de vida es menor, y por tanto la digestión de las proteínas antigénicas es limitada y deficiente generando una tasa residual mayor que en los lechones con mayor edad (Hartman *et al.*, 1961; Efird *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 2010). Aunado a la variabilidad ya mencionada, también puede ser explicada por el reducido número de muestras procesadas (Steel y Torrie, 1980).

A pesar de estos detalles, la permanencia de las subunidades de la proteína  $\beta$ -conglucina (7S) en íleon, ya ha sido reportada por Zhao *et al.* (2008) y Wang *et al.* (2009), debido a la estabilidad a la digestión de  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo más resistente  $\beta$  (Huang *et al.*, 2015).

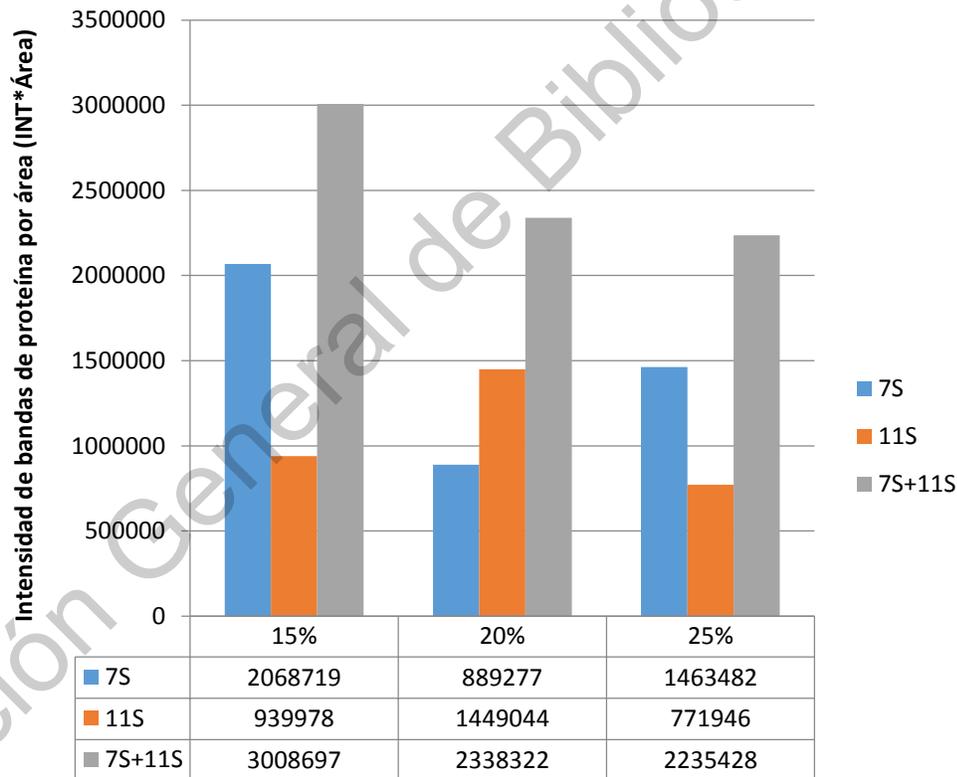


**Digestas ileales con diferente concentración de pasta de soya en dieta (15%, 20% y 25%)**

**Figura 17.** Concentración de proteína (INT\*Área) en digestas de íleon con diferentes concentraciones de pasta de soya en dieta: 15%, 20% y 25%. \* 7S+11S: Concentración total de subunidades de las fracciones de 7S y 11S por porcentaje de inclusión de pasta de soya.

En el caso de la proteína 11S, al igual que 7S, tuvo estabilidad y resistencia a la proteólisis, razón por la cual se encontró en los contenidos ileales (Wang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2013). Se ha reportado resistencia a la digestión por pepsina de A<sub>3</sub>, A<sub>X</sub> y B<sub>X</sub>, siendo incluso B<sub>X</sub> resistente a la tripsina atribuido a su estructura hidrofóbica que la hace ser más compacta y difícil de digerir al estar en contacto con un tracto gastrointestinal inmaduro con baja actividad enzimática y un pH poco óptimo (pH >4.5) para una actividad adecuada de la pepsina (pH 2-4) (Moreno, 2007; Wang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2016).

En la Figura 18, se puede observar, que la concentración de 7S es mayor a la de 11S, lo que indica que esta última fue más susceptible a la digestión que 7S (Zhao *et al.*, 2008), además la proteína  $\beta$ -conglucina, es en general resistente al tránsito a través del estómago y el intestino delgado, principalmente para la subunidad  $\beta$  (Amigo-Benavent *et al.*, 2011). En dicha figura no se muestran los resultados de las muestras con 0% de inclusión de pasta de soya ya que en ellas no se detectaron las proteínas antigénicas 7S y 11S.



Digestas ileales con diferente concentración de pasta de soya en dieta

**Figura 18.** Concentración total de las proteínas  $\beta$ -conglucina (7S) y glicinina (11S) (INT\*Área) en digestas ileales con diferente porcentaje de inclusión de pasta de soya en dieta: 15%, 20% y 25%.

La concentración de proteínas alergénicas de la soya en las muestras de digestas ileales de lechones recién destetados demuestra que la digestión de dichas proteínas se lleva a cabo de manera parcial, permaneciendo altas concentraciones de estas proteínas principalmente en la última porción del intestino delgado, con una mayor concentración de la proteína  $\beta$ -conglucina (7S) que de la proteína glicinina (11S). Aguilera *et al.* (2015) reportaron una digestibilidad ileal aparente de proteína cruda de la pasta de soya en lechones destetados del 85.4% (en base seca); lo que indica que el 14.6% de la proteína es indigerible pudiendo estar compuesta en su mayoría por proteínas antigénicas presentes en la parte terminal del intestino delgado.

Aunado a lo anterior, se obtuvieron datos muy fluctuantes entre las concentraciones de cada subunidad, y cabe la posibilidad de atribuirlo a que esta investigación fue realizada en modelos vivos, lo cual confiere respuestas distintas del organismo de cada animal lo que genera aún más variación en los resultados; y a que la cantidad de muestras procesadas fue muy poca.

Este estudio es un aporte al conocimiento acerca de la digestión de las proteínas antigénicas de la pasta de soya en lechones recién destetados debido a las problemáticas que estas generan en el ciclo productivo del cerdo, además de ser una base para futuras investigaciones donde sea posible disminuir o eliminar el impacto negativo que tienen estas proteínas en la salud gastrointestinal de estos animales, ya que los efectos de dichas proteínas se ven directamente reflejados en pérdidas económicas, por lo que es importante buscar y basar la producción en la sustentabilidad con lo cual sea posible lograr el equilibrio de todos los aspectos de producción, economía y por supuesto las repercusiones ecológicas generadas de este ciclo productivo.

## VII. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que el origen de colecta de las pastas de soya afecta la concentración de proteínas antigénicas, principalmente de la subunidad  $\alpha'$  de la  $\beta$ -conglucina (7S) y de la subunidad A de glicina (11S); y que de manera general la glicina (B>A>A3) se presenta en mayor concentración que la  $\beta$ -conglucina ( $\beta>\alpha'>\alpha$ ) en las pastas de soya.

Los lechones alimentados con pasta de soya durante 14 días posdestete digirieron más fácilmente las proteínas antigénicas  $\beta$ -conglucina (7S) en estómago que la glicina (11S) de las 3 a las 12 horas postconsumo; permaneciendo indigestibles en íleon de 3 a 12 horas postconsumo. La subunidad  $\alpha'$  de la fracción 7S fue altamente digestible en el tracto digestivo de lechones, mientras que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  fueron poco digeridas. Las subunidades ácidas de la fracción 11S fueron digestibles, mientras que las subunidades básicas fueron poco digestibles.

Los lechones alimentados con niveles crecientes de pasta de soya durante los 7 primeros días posdestete mostraron estabilidad y resistencia a la proteólisis de las proteínas antigénicas  $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S) hasta íleon, sin mostrar diferencias de acuerdo al porcentaje de inclusión de pasta de soya.

La concentración de proteínas antigénicas en íleon de acuerdo al nivel de pasta de soya en las dietas (15, 20 y 25%) no presentó diferencias al ser ajustadas al consumo diario de alimento.

## **VIII. IMPLICACIONES**

Esta investigación permitió conocer las diferencias que existen entre las diferentes pastas de soya respecto a su contenido proteico, y que este puede determinarse mediante técnicas que permitan evaluar las materias primas utilizadas para la formulación de dietas en cerdos y de esta manera mejorar la nutrición. En cuanto a la determinación de las proteínas antigénicas de la soya a nivel del tracto gastrointestinal generó conocimientos sobre el impacto del proceso de digestión en los lechones destetados sobre estas proteínas, y su presencia en contenidos intestinales sugiere una resistencia alta a la digestión por parte de estas fracciones proteicas.

Los resultados obtenidos en este trabajo son un aporte al conocimiento acerca de la caracterización de las proteínas antigénicas de la PS y de su comportamiento en la digestión en lechones alimentados con PS.

## **IX. RECOMENDACIONES DEL ESTUDIO**

Para evitar realizar pool de muestras de contenidos intestinales como los que se tuvieron que hacer en este proyecto, se recomienda contar con el mayor volumen de muestra posible que permita ser representativa (tomar muestras de contenidos de la parte proximal, media y distal del intestino delgado), y por ende tratar en la medida posible evitar la variabilidad inherente en los estudios biológicos para poder llegar a conclusiones contundentes.

Se recomienda continuar con estudios de digestión de proteínas antigénicas en lechones alimentados con pasta de soya, empleando anticuerpos producidos a partir de péptidos sintetizados de las proteínas antigénicas de pasta de soya.

## X. LITERATURA CITADA

Aguilera, A., Reis de Souza, T., Mariscal-Landín, G., Montaña, S., Bernal, M. 2014. Standardized ileal digestibility of proteins and amino acids in sesame expeller and soya bean meal in weaning piglets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 1-9. ISSN: 1439-0396. DOI: 10.1111/jpn.12278. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1439-0396/earlyview](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1439-0396/earlyview)

Ambi, L. F. 2011. Utilización de saborizante en la dieta de cerdos Landrace-York durante las etapas de crecimiento y engorde. Tesis de licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Pecuarias. Escuela de Ingeniería Zootécnica. Riobamba, Ecuador. Pp. 3, 5, 7.

Amigo-Benavent, M., Athanasopoulos, V. I., Ferranti, P., Villamiel, M., Del Castillo, M. D. 2009. Carbohydrate moieties on the in vitro immunoreactivity of soy  $\beta$ -conglycinin. *Food Res. Int.* 42: 819-825.

Amigo-Benavent, M., Clemente, A., Ferranti, P., Caira, S., Del Castillo, M. D. 2011. Digestibility and immunoreactivity of soybean  $\beta$ -conglycinin and its deglycosylated form. *Food Chem.* 129: 1598-1605.

Argenzio, R. A. 2004. Secreciones del estómago y de las glándulas accesorias. En: Reece, W. O. (Ed), Dukes. Fisiología de los animales domésticos. 12ª Edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 467-482

Astwood, J. D., LEach, J. N., Fuchs, R. L. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnol.* 14: 1269-1273.

Bergmann, R., Du Plessis, L., Westcott, M. 2004. Pig farming. 1ª Edición. Ed. Creda Communications. Cape Town, Sudáfrica. 48 pág.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bu, G., Zhu, T., Chen, F. 2017. The structural properties and antigenicity of soybean glycinin by glycation with xylose. *J. Sci. Food Agric.* 97: 2256-2262.

Campbell, J., Crenshaw, J., Polo, J. 2013. The biological stress of early weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4: 1-4.

Carrão-Panizzi, M., Kwanyuen, P., Zeynep-Erhan, S., De Oliveira Negrão Lopes, I. 2008. Genetic variation and environmental effects on beta-conglycinin and glycinin content in Brazilian soybean cultivars. *Pesq. Agropec. Bras.* 43: 1105-1114.

Champe, P. C.; Harvey, R. A.; Ferrier D. R. 2006. Bioquímica ilustrada. 3ª Edición. Ed. Artmed. USA. Pp. 1.

Chen, F., Hao, Y., Piao, X. S., Ma, X., Wu, G. Y., Qiao, S. Y., Li, D. F., Wang, J. J. 2011. Soybean-derived  $\beta$ -conglycinin affects proteome expression in pig intestinal cells in vivo and in vitro. *J. Anim. Sci.* 89: 743-753.

Close, W. H., Cole, D. J. A. 2004. Nutrición de cerdas y verracos. 1ª Edición. Alltech Technical Publications. México. 341 pág.

Contreras, J., Calderón, A., López, J. 2012. La nutrición del lechón en relación con los puntos críticos en el destete. *Anaporc: revista de la Asociación de Porcinocultura Científica.* 9: 24-28.

Deng, K., Huang, Y., Hua, Y. 2012. Isolation of glycinin (11S) from lipid-reduced soybean flour: effect of processing conditions on yields and purity. *Molecules.* 17: 2968-2979.

Dunshea, F. R. 2007. Cambios metabólicos y endocrinos en el periodo del destete. En: Pluske, J. R., Le Dividich, J., Verstegen, M. W. A. (Eds). El destete en el ganado porcino. Conceptos y aplicaciones. 1ª Edición. Ed. Servet. España. Pp. 51-72.

Efird, R. C., Armstrong, W. D., Herman, D. R. 1982. The development of digestive capacity in young pigs: effects of age and weaning pigs. *J. Anim. Sci.* 55: 1380-1387.

Fernandes-Galão, O., Inês-Teixeira, A., Alves-Moreira, M., Carrão-Panizzi, M., Vergílio-Visentainer, J. 2013. Variation in genetic and environmental effects of beta-conglycinin (7S) and glycinin (11S) protein fractions in conventional and GM soybean cultivars grown in Southern Brazil. *Semina: Ciências Agrárias.* 34: 683-692

Folch, J., Lees, M., Stanley, S. G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.

Fu, C. J., Jez, J. M., Kerley, M. S., Allee, G. L., Krishnan, H. B. 2007. Identification, characterization, epitope mapping, and three-dimensional modeling of the  $\alpha$ -subunit of  $\beta$ -conglycinin of soybean, a potential allergen for young pigs. *J. Agric. Food Chem.* 55: 4014-4020.

Galbas, M., Borys, K., Wozniak, A., Selwet, M. 2011. Impact of globulins derived from genetically modified and conventional soybean on swine lymphocyte proliferation in vitro cultures. *Ann. Anim. Sci.* 11: 497-505

García, C., Martínez, B., Amaro, G., Aguirre, A., Angulo, M. 2008. Manual de evaluación de la unidad de producción porcina. SAGARPA, INIFAP, CIPRAS. Campo Experimental "Zacatepec". Publicación Especial No. 45. Zacatepec, Morelos. 48 pág.

García-Contreras, A., De Loera, Y., Yagüe, A., Guevara, J., García, C. 2012. Alimentación práctica del cerdo. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* 6: 21-50.

Gilani, G. S., Xiao, C. W., Cockell, K. A. 2012. Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *Br. J. Nutr.* 108: 315-332.

Gómez, S. 2007. Alimentación de lechones al destete. En: Gómez, S., Mariscal, G., Mejía, C., Braña, D., Salazar, G. (Eds), Estrategias de alimentación y manejo del cerdo. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP-SAGARPA. Publicación Técnica No. 3. Colón, Querétaro, México. Pp. 14-29.

Gómez-Insuasti, A. S., Vergara, D., Argote, F. 2008. Efecto de la dieta y edad del destete sobre la fisiología digestiva del lechón. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* 6: 32-41.

Gómez-Soto, J. G., Reis de Souza, T. C., Mariscal-Landín, G., Aguilera-Barreyro, A., Bernal-Santos, M. G., Escobar-García, K. 2017. Gastrointestinal morphophysiology and presence of kafirins in ileal digesta in growing pigs fed sorghum-bases diets. *J. Appl. Anim. Res.* DOI: 10.1080/09712119.2017.1371607

Hartman, P. A., Hays, V. W., Baker, R. O., Neagle, L. H., Catron, D. V. 1961. Digestive enzyme development in the young pig. *J. Anim. Sci.* 20: 114-123.

Heo, J., Opapeju, F., Pluske, J., Kim, J., Hampson, D., Nyachoti, C. 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J. Anim. Physiol. An. N.* 97: 207-237.

Herd, T. H. 2009. Digestión y absorción: los procesos no fermentativos. En: Cunningham, J. G. y Klein, B. G. (Eds). Fisiología veterinaria. 4ª Edición. Ed. Elsevier. Madrid, España. Pp. 337-363.

Hill, G. D. 2004. Grain legumes and oilseeds. The way ahead. En: Muzquiz, M., Hill, G. D., Cuadrado, C., Pedrosa, M. M., Burbano, C. (Eds). Recent advances of

research in antinutritional factors in legume seeds and oilseeds. EAAP publication No. 110. Ed. Wageningen Academic. Toledo, Spain. Pp. 353-364.

Huang, Q., Xu, H. B., Yu, Z., Liu, S., Gao, P. 2015. In vivo digestive stability of soybean  $\beta$ -conglycinin  $\beta$ -subunit in WZS Minipigs. *Biomed. Environ. Sci.* 28: 85-88.

Huntzicker, S., Peterson, M., Wachter, D. 2009. Guía para criar cerdos sanos. Extensión Cooperativa de la Universidad de Wisconsin-Extensión. USA. 6 pág. Disponible en: <http://kewaunee.uwex.edu/files/2010/05/Guiaparacriarcerdossanos.pdf> [Consultado 04-09-2016]

Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM); Fundación Produce Chiapas (PRODUCE). 2003. Programa estratégico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología del estado de Chiapas. Cadena Agroalimentaria de la Soya. México. 62 pág. Disponible en: <https://www.cofupro.org.mx/cofupro/Publicacion/Archivos/penit54.pdf> [Consultado 29-11-2017]

Jin, Z., Yang, Y. X., Choi, J. Y., Shinde, P. L., Yoon, S. Y., Hahn, T. W., Lim, H. T., Park, Y., Hahm, K. S., Joo, J. W., Chae, B. J. 2008. Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as a novel antimicrobial agent in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 86: 1562-1572.

Kaviani, B., Kharabian, A. 2008. Improvement of the nutritional value of soybean [*Glycine max* (L) Merr.] seed with alteration in protein subunits of glycinin (11S globulin) and  $\beta$ -conglycinin (7S globulin). *Turk J. Biol.* 32: 91-97

Kim, H. T., Choi, U. K., Ryu, H. S., Lee, S. J., Kwon, O. S. 2011. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814: 1178-1187

King, R. H., Pluske, J. R. 2007. El manejo nutricional del lechón en la preparación para el destete. En: Pluske, J. R., Le Dividich, J., Verstegen, M. W. A. (Eds). El destete en el ganado porcino. Conceptos y aplicaciones. 1ª Edición. Ed. Servet. España. Pp. 25-40.

Kitamura, K., Kaizuma, N. 1981. Mutant strains with low level of subunits of 7S globulin in soybean (*Glycine max* Merr.) seed. *Japan J. Breed.* 31: 353-359.

Koeslag, J. 2008. Porcinos. Manuales para educación agropecuaria. Producción animal. 3ª Edición. Ed. Trillas. México. 98 pág.

Krishnan, H. B. 2005. Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content. *Crop Sci.* 45: 454-461

Krishnan, H. B., Nelson, R. L. 2011. Proteomic analysis of high protein soybean (*Glycine max*) accessions demonstrates the contribution of novel glycinin subunits. *J. Agric. Food Chem.* 59: 2432-2439

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

Lee, H. S. 2005. Clinical effects of intake of Juice valley and Gogu valley towards fecal microflora of healthy human volunteers. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 540-542.

Liu, C., Wang H., Cui, Z., He, X., Wang X., Zeng, X., Ma. H. 2007. Optimization of extraction and isolation for 11s and 7s globulins of soybean seed storage protein. *Food Chem.* 102: 1310-1316.

Lowry, O. H., Rosbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265. 1951.

Mariscal, L. G., Gómez, R. S. 2007. Aspectos importantes en la composición de ingredientes comúnmente utilizados en la alimentación del pie de cría. En: Mejía, G. C. A., Cuarón, I. J. A., Rentería, F. J. A., Braña, V. D., Mariscal, L. G. Gómez,

R. S. (Eds). Alimentación del hato reproductor porcino. Teoría y práctica dirigidas a elevar la eficiencia productiva del pie de cría. 1ª Edición. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP-SAGARPA. Libro Científico No. 1, Colón, Qro., México. 2007. Pp. 186-215.

Mathews, C.K.; Van Holde, K. E.; Appling, D. R.; Anthony-Cahill, S. J. 2013. Bioquímica. 4ª Edición. Ed. Pearson Educación. Madrid, España. 1379 pág.

McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A. 2002. Nutrición animal. 6ª Edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 600 pág.

Mills, E. N. C., Jenkins, J., Marigheto, N., Belton, P. S., Gunning, A. P., Morris, J. 2002. Allergens of the cupin superfamily. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 925-929.

Moreno, F. J. 2007. Gastrointestinal digestion of food allergens. *Biomed. Pharmacother.* 61: 50-60.

Mota-Rojas, D., Roldán-Santiago, P., Pérez-Pedraza, E., Martínez-Rodríguez, R., Hernández-Trujillo, E., Trujillo-Ortega, M. E. 2014. Factores estresantes en lechones destetados comercialmente. *Vet. Méx.* 45: 37-51.

Mujoo, R., Trinh, D. T., Ng, P. K. 2003. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. *Food Chem.* 82: 265-273.

Natarajan, S., Khan, F., Song, Q., Lakshman, S., Cregan, P., Scott, R., Shipe, E., Garret, W. 2016. Characterization of soybean storage and allergen proteins affected by environmental and genetic factors. *J. Agric. Fodd Chem.* 64: 1433-1445

NRC. National Research Council. 1982. United States-Canadian Tables of feed composition: Nutritional Data for United States and Canadian Feeds. 3ª Revisión. Ed. National Academies Press. Washington, DC. USA. 156 pág.

NRC. National Research Council. 2012. Nutrient requirements of swine. 11ª Edición. Ed. National Academies Press. Washington, DC. USA. 424 pág.

Peng, C., Cao, C., He, M., Shu, Y., Tang, X., Wang, Y., Zhang, Y., Xia, X., Li, Y., Wu, J. J. 2018. Soybean glycinin and  $\beta$ -conglycinin induced intestinal damage in piglets via p38/JNK/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* 66: 9534-9541.

Pérez, O. 2007. Sistema de producción porcina. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SAGARPA. 8 pág. Disponible en:

<http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Sistema%20de%20producci%C3%B3n%20Porcina.pdf> [Consultado 04-09-2016]

Pluske, J. R., Le Dividich, J., Verstegen, M. W. A. 2007. El destete en el ganado porcino. Conceptos y aplicaciones. 1ª Edición. Ed. Servet. España. 444 pág.

Pond, W., Maner, J., Harris, D. 1991. Pork production systems. Efficient use of swine and feed resources. 1ª Edición. Ed. AVI. New York, USA. 439 pág.

Puppo, M. C., Arocha, M., Pérez, G., Ribotta, P., Añón, M. C. 2007. Soja. En: León, A. E., Rosell, C. M. (Eds.) De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. 1ª Edición. Córdoba, Argentina. Pp. 319-362.

Reis de Souza, T. 2017. Reporte proyecto de RED “Efecto de componentes dietéticos antinutricionales y funcionales sobre la salud intestinal en dos modelos animales: ratas y lechones. PRODEP-SEP, México.

Reis de Souza, T., Mariscal, G., Escobar, K. 2010. Algunos factores fisiológicos y nutricionales que afectan la incidencia de diarreas posdestete en lechones. *Vet. Méx.* 41: 275-288.

Reis de Souza, T., Mariscal, G., Escobar, K., Aguilera, A., Magné, A. 2012. Cambios nutrimentales en el lechón y desarrollo morfofisiológico de su aparato digestivo. *Vet. Méx.* 43: 155-173.

Ridner, E. 2006. Soja. Propiedades nutricionales y su impacto en la salud. 1ª Edición. Ed. Grupo Q. Sociedad Argentina de Nutrición. Argentina. 98 pág.

San Miguel-Hernández, A., Martín, B., Armentia-Medina, A. 2012. Algunos aspectos de la hipersensibilidad alérgica alimentaria a frutas y vegetales. *Gac. Med. Bilbao.* 109: 104-112.

Singh, A., Meena, M., Kumar, D., Dubey, A. K., Hassan, M. I. 2015. Structural and functional analysis of various globulin proteins from soy seed. *Crit. Rev. Sci. Food Nutr.* 55: 1491-502.

Steel, G. D., Torrie, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics. 2ª Edición. Ed. McGraw-Hill. New York, USA. 622 pág.

Sun, P., Li, D., Dong, B., Qiao, S., Ma, X. 2008. Effects of soybean glycinin on performance and immune function in early weaned pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 62: 313-321.

Taliercio, E., Kim, S. W. 2013. Epitopes from two soybean glycinin subunits are antigenic in pigs. *J. Sci. Food Agric.* 93: 2927-2932.

Thompson, P. 2003. Swine care handbook. National Pork Board. USA. 41 pág.  
Disponibile en:  
[http://texaspork.org/content/uploads/2015/08/Swine\\_Care\\_Handbook\\_2003.pdf](http://texaspork.org/content/uploads/2015/08/Swine_Care_Handbook_2003.pdf)

[Consultado 04-09-2016]

Tokach, M., Dritz, S., Goodband, R., Nelssen, J. 2007. Necesidades nutricionales del cerdo destetado. En: Pluske, J. R., Le Dividich, J., Verstegen, M. W. A. (Eds). El destete en el ganado porcino. Conceptos y aplicaciones. 1ª Edición. Ed. Servet. España. Pp. 269-307.

- Torrallardona, D. 2010. Spray dried animal plasma as an alternative to antibiotics in weanling pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23: 131-148.
- Van Ree, R. 2002. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129: 189-197-
- Wang, T., Qin, G. X., Zhao, Y., Sun, Z. W. 2009. Comparative study on the stability of soybean (*Glycine max*)  $\beta$ -conglycinin in vivo. *Food Agric. Immunol.* 20: 295-304.
- Wang, T., Qin, G., Sun, Z., Zhao, Y. 2014. Advances of research on glycinin and  $\beta$ -conglycinin: A review of two mayor soybean allergenic proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54: 850-862.
- Wang, T., Qin, G., Sun, Z., Zhao, Y., Zhang, B. 2010. Comparative study of the residual rate of immunoreactive soybean glycinin (11S) in the digestive tract of pigs of different ages. *Food Agric. Immunol.* 21: 201-208.
- Wei, Z., Wie, H., Lin, Q., Cheng, X., Tong, M., Zhu, L., Chen, R., He, G. 2009. Understanding rice plant resistance to the Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*): A proteomic approach. *Proteomics.* 9: 2798–2808.
- Wu, J. J., Cao, C. M., Ren, D. D., Zhang, Y., Kou, Y. N., Ma, L. Y., Feng, S. B., Li, Y., Wang, X. C. 2016a. Effects of soybean antigen proteins on intestinal permeability, 5-hidroxitrytamine levels and secretory IgA distribution in the intestine of weaned piglets. *Ital. J. Anim. Sci.* 15: 174-178
- Wu, J. J., Zhang, Y., Dung, J. H., Cao, C. M., Li, B., Feng, S. B., Ding, H. Y., Ma, L. Y., Wang, X. C., Li, X. 2016b. Allergens and intestinal damage induced by soybean antigen proteins in weaned piglets. *Ital. J. Anim. Sci.* 14: 437-445
- Xiao, K., Jiao, L., Cao, S., Song, Z., Hu, C., Han, X. 2016. Whey protein concentrate enhances intestinal integrity and influences transforming growth factor-

$\beta$ 1 and mitogen-activated proteins kinase signalling pathways in piglets after lipopolysaccharide challenge. *Br. J. Nutr.* 115: 984-993

Yang, W. W., González de Mejía, E., Zheng, H., Lee, Y. 2011. Soybean allergens: Presence, detection and methods for mitigation. En: El-Shemy, H. (Ed.), Soybean and health. InTechOpen. Rijeka, Croatia. Pp. 433-464.

Yang, Y., Wang, Z., Wang, R., Sui, X., Qi, B., Han, F., Li, Y., Jiang, L. 2016. Secondary structure and subunit composition of soyprotein in vitro digested by pepsin and its relation with digestibility. *Biomed Res., Int.* 2016: 1-11.

Zhao, Y., Qin, G., Sun, Z., Zhang, X., Bao, N., Wang, T., Zhang, B., Zhang, B., Zhu, D., Sun, L. 2008. Disappearance of immunoreactive glycinin and  $\beta$ -conglycinin in the digestive tract of piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 62: 322-330.

Zhao, Y., Qin, G. X., Sun, Z. W., Zhang, B., Wang, T. 2010. Stability and immunoreactivity of glycinin and  $\beta$ -conglycinin to hydrolysis in vitro. *Food Agric. Immunol.* 21: 253-263.

Zhao, Y., Zhang, B., Qin, G., Wang, T., Wang J., Han, R. 2013. Distribution of glycinin in the gastrointestinal tissue of pigs at different growth stages. *Food Agric. Immunol.* 24: 371-378.

## XI. APÉNDICE

### APÉNDICE 1

Método de extracción de glicinina y  $\beta$ -conglucina descrito por Liu *et al.* (2007).

1. Se pesó 1 gr de cada muestra por duplicado, y se colocaron en tubos para centrifuga. En cada tubo se agregaron 15 ml del reactivo Tris-HCl 0.03M a pH 8.5. Se agitaron por 1hr a 45°C a baño maría.
2. Se centrifugaron a 9000xg por 30 minutos a 4°C.
3. Se separó y reservó el sobrenadante de cada tubo.
4. La muestra del residuo o precipitado se resuspendió en 15 ml de reactivo Tris-HCl 0.03M a pH 8.5 y se agitó una h a 45°C a baño maría.
5. Los tubos se centrifugaron a 9000xg por 30 min a 4°C. Se extrajo y reservó el sobrenadante y se eliminó el precipitado.
6. Los dos sobrenadantes reservados anteriormente (Número 3 y 5) se combinaron. En promedio se sumaron 25 ml de sobrenadante, y se le añadió 0.07225 g de bisulfito de sodio (SBS) 0.01 M sin hacer solución previa y se ajustó el pH del sobrenadante a 6.4 con una solución de HCl 2N y se almacenó a 4°C durante toda la noche.
7. Posteriormente se centrifugó a 6500xg por 20 min a 4°C. El precipitado resultante se reservó, correspondiendo a la fracción 11S (glicinina).
8. Al sobrenadante se le agregaron 0.055 g de NaCl 0.25M (sólido) y se ajustó el pH a 5.5 con HCl 2N. Se agitó a temperatura ambiente por 30 min.
9. Posteriormente se centrifugó a 9000xg por 30 min a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante y el precipitado resultante se eliminó.
10. El sobrenadante resultante se diluyó dos veces con agua desionizada, se ajustó el pH a 4.8 con HCl 2N. Se centrifugó a 6500xg por 20 min a 4°C.
11. Se eliminó el sobrenadante, el precipitado resultante corresponde a la fracción 7S ( $\beta$ -conglucina).

12. De cada fracción (7S y 11S) se diluyó el precipitado con agua desionizada, se ajustó el pH a 7, y posteriormente se colocó en membranas de celulosa para diálisis para peso molecular de 12-14000 daltons de Laboratorios Spectrum.
13. Se dializaron toda una noche en agua destilada, en agitación y en refrigeración; al día siguiente se cambió el agua dos veces al día, y el tercer día en la mañana se cambió por agua desionizada y por la tarde se dio por terminada la diálisis.
14. Se extrajeron las fracciones de cada membrana y se liofilizaron.

## **APÉNDICE 2**

### Método de pulverización de nitrocelulosa con antígeno

1. Se añadió 0.5 ml de dimetil sulfoxido (DMSO) a una tira de nitrocelulosa de 1 x 0.5 cm aproximadamente, previamente recortada en minúsculos pedacitos en un tubo eppendorf. La mezcla se sometió a vigorosa agitación en el vortex hasta que se la nitrocelulosa se disolvió totalmente. Dicha mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por una hora (permite esterilizar la nitrocelulosa).
2. Se añadió 0.5 ml de buffer de carbonatos pH 9.6 lentamente, gota a gota, siempre en continua agitación en un vortex (este procedimiento permitió que la celulosa se particule en un polvo muy fino).
3. La mezcla anterior se centrifugó a 10000 rpm durante un minuto. Se descargó el sobrenadante y se añadió 1 ml de PBS, con lo cual se resuspendió la nitrocelulosa (esto permitió lavar perfectamente el papel y eliminar el DMSO). Después de dicho lavado la nitrocelulosa disminuyó considerablemente de volumen. Se hicieron cuatro lavados más, resuspendiendo totalmente cada vez la nitrocelulosa.

### APÉNDICE 3

ReadyPrep 2D Cleanup Kit (Cat. 1632130)

1. Se pesó 1 gr de pasta de soya desgrasada y molida, y se diluyó en 15 ml de PBS. De dicha solución se tomaron 100  $\mu$ l para depositarlos en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Se adicionaron 300  $\mu$ l de “Agente de precipitación 1” en la muestra y fue homogenizada mediante vortex. Se incubó por 15 minutos.
3. A continuación se adicionaron 300  $\mu$ l de “Agente de precipitación 2” a la mezcla anterior. Nuevamente se homogenizó mediante vortex.
4. La mezcla anterior fue sometida a centrifugación 14000 rpm por 5 minutos.
5. Se removió el sobrenadante.
6. Se adicionaron 40  $\mu$ l de “Wash reagent 1”, se resuspendió el pellet, y después se centrifugó a 14000 rpm/5 minutos.
7. Se removió el sobrenadante.
8. Se añadió 25  $\mu$ l de “Readyprep proteomic grade water” (Cat. 1632091), y se homogenizó mediante vortex de 10-20 segundos.
9. Se agregó 1 ml de “Wash reagent 2” (previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por al menos 1 hora), y 5 ml de “Wash reagent 2 additive”. Se sometió a homogenización mediante vortex por 1 minuto.
10. A continuación, la mezcla fue incubada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. A su vez fue homogenizada por vortex por 30 segundos cada 10 minutos durante el periodo de incubación.
11. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

## MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE WEI

- Buffer de extracción: SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2%, Tris-HCl 66 mM pH 6.8.
  - Solución de precipitación: Ácido tricloroacético (TCA) 10%(p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 0.11%, en acetona.
  - Solución de rehidratación: Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 1.2%(p/v), DTT 43mM, Tris-HCl 30mM pH8.5
1. Se pesó 1 gr de pasta de soya desgrasada y molida, y se suspendió en 10 ml de buffer de extracción\*.
  2. Se incubó por 1 hora\*\* en agitación horizontal a 4 °C.
  3. Luego se centrifugó a 6000 rpm por 20 minutos a 4 °C.
  4. Al sobrenadante resultante se le adicionó 9 mL de la solución de precipitación (se descartó precipitado).
  5. Se incubó por media hora a -20 °C y el pellet se separó por centrifugación a 6000 rpm por 20 minutos a 4 °C.
  6. Posteriormente, el pellet se lavó tres veces con 500  $\mu$ l de acetona fría, centrifugando cada vez en las condiciones ya descritas.
  7. El pellet se resuspendió en buffer de rehidratación\*\*\*.

\* El buffer de extracción utilizado fue Tris-HCL 0.03 M pH 8.5 (buffer utilizado para la extracción de las fracciones 7S y 11S según Liu *et al.* (2007)).

\*\*El tiempo de incubación fue modificado a treinta minutos.

\*\*\*Se utilizó 200  $\mu$ l de PBS 1X para resuspender el pellet.