



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Doctorado en Ciencias Biológicas

**Efecto del contenido de taninos y kafirinas del sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] incorporado a la dieta sobre la morfofisiología gastrointestinal y la síntesis de proteína muscular en cerdos en crecimiento-finalización.**

## **Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

M. en C. José Guadalupe Gómez Soto

Codirigido por:

Dra. Tércia Cesária Reis de Souza

Dr. Gerardo Mariscal Landín

**Santiago de Querétaro, Qro.**

**Junio del 2017**

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Doctorado en Ciencias Biológicas

**Efecto del contenido de taninos y kafirinas del sorgo [*Sorghum bicolor*  
(L.) Moench] incorporado a la dieta sobre la morfofisiología  
gastrointestinal y la síntesis de proteína muscular en cerdos en  
crecimiento-finalización.**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

M. en C. José Guadalupe Gómez Soto

Codirigido por:

Dra. Tércia Cesária Reis de Souza

Dr. Gerardo Mariscal Landín

Dra. Tércia Cesária Reis de Souza  
Presidente

Dr. Gerardo Mariscal Landín  
Secretario

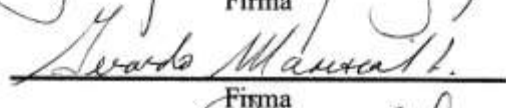
Dra. María Guadalupe Bernal Santos  
Vocal

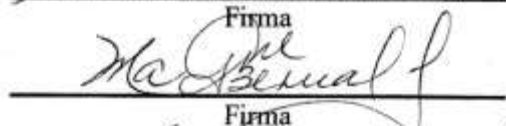
Dra. Araceli Aguilera Barreyro  
Suplente

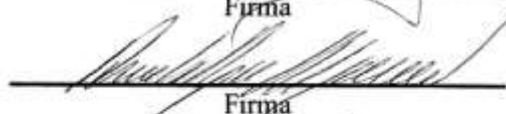
Dr. Konisgmar Escobar García  
Suplente

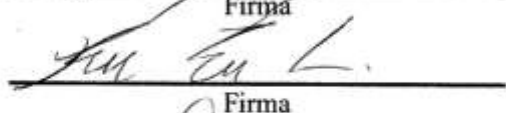
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Director de la Facultad

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro, Qro.  
Junio 2017

## RESUMEN

Tradicionalmente los taninos del sorgo son considerados factores antinutricionales que afectan el aprovechamiento digestivo de los nutrientes. Sin embargo, el efecto de las kafirinas, que son las proteínas más abundantes, ha sido poco estudiado. Se plantearon tres experimentos con el objetivo de evaluar el efecto del nivel de taninos y/o kafirinas del sorgo adicionado a las dietas para cerdos en diferentes etapas de crecimiento sobre el desarrollo productivo y morfofisiológico del tracto digestivo (peso de órganos, pH de digestas, actividad enzimática del páncreas y morfología intestinal). En el primer experimento se emplearon lechones recién destetados y se evaluó el efecto del consumo de dietas elaboradas con sorgos conteniendo diferentes niveles de taninos, sobre las variables morfofisiológicas del tracto digestivo. En el segundo experimento se estudió el efecto del consumo de sorgos con diferentes niveles de taninos y kafirinas sobre las variables morfofisiológicas del tracto digestivo y la presencia de kafirinas en el contenido ileal. En el tercer experimento se evaluó el comportamiento productivo del cerdo y la expresión de los genes *eIF2B1* y *eIF4e*, relacionados con el inicio de la síntesis de la proteína muscular, en dos fases de producción (crecimiento y finalización); los cerdos consumieron dietas elaboradas con sorgos con diferentes niveles de taninos y kafirinas. Los resultados indican que la inclusión de un sorgo alto en taninos en la dieta no causó un efecto detrimental sobre las características morfofisiológicas del tracto digestivo en lechones. Incrementó la actividad de la tripsina pancreática en los cerdos en crecimiento que consumieron los sorgos altos en taninos y kafirinas. Se detectó una alta concentración de kafirinas en los contenidos ileales de los cerdos que consumieron las dietas con un elevado nivel de kafirinas. Esto indica que probablemente, la digestibilidad de estas proteínas se redujo en la medida que se incrementó el nivel de kafirinas en el sorgo. En cerdos en crecimiento-finalización el nivel de kafirinas de los sorgos no comprometió el comportamiento productivo, mientras que el alto nivel de taninos disminuyó el consumo diario de alimento. La dieta y el sexo no influyeron en la expresión de los genes; sin embargo, la fase de producción influyó en la expresión del gen *eIF4e*, ya que en los cerdos en la fase de finalización este gen tuvo una mayor expresión. Para el gen *eIF2B1* se presentó una interacción entre la fase y la dieta consumida. Este gen se expresó más en los cerdos que consumieron la dieta HT-HK respecto a los que consumieron la dieta de maíz y HT-LK. De igual manera, los cerdos que consumieron las dietas elaboradas con los sorgos bajos en taninos, expresaron más este gen que los que consumieron la dieta HT-LK. Se concluye que no sólo el nivel de taninos afecta las variables productivas, sino que el nivel de kafirinas también afecta diversas variables morfofisiológicas, por lo que estos dos componentes del sorgo deben ser considerados en conjunto cuando se formulen dietas para cerdos.

**(Palabras clave:** taninos, kafirinas, cerdos, genes, enzimas)

## SUMMARY

Traditionally sorghum tannins are considered antinutritional factors that affect the digestive utilization of nutrients. However, the effect of kafirins, which are the most abundant and poorly digestible proteins, have been little studied. Three experiments were carried out with the objective of evaluating the effect of the level of tannins and / or kaffirins of sorghum added to the diets for pigs in different stages of growth on the productive and morphophysiological development of the digestive tract (organ weight, enzymatic activity of the pancreas and intestinal morphology). In the first experiment, newly weaned piglets were used and the effect of the consumption of diets made with sorghums containing different levels of tannins on the morphophysiological variables of the digestive tract was evaluated. In the second experiment the effect of sorghum consumption with different levels of tannins and kaffirins on the morphophysiological variables of the digestive tract and the presence of kaffirins in the ileal content were studied. In the third experiment the productive behavior and expression of the eIF2B1 and eIF4e genes, related to the initiation of muscle protein synthesis, were evaluated in two phases of production (growth and finishing), which consumed diets made with sorghum different levels of tannins and kaffirins. The results indicate that the inclusion of a high sorghum in tannins in the diet, did not cause a detrimental effect on the morphophysiological characteristics of the digestive tract in piglets. The activity of pancreatic trypsin was increased in growing pigs that consumed the high sorghums in tannins and kaffirins. A high concentration of kaffirins was detected in the ileal contents of the pigs that consumed the diets with a high level of kaffirins. This indicates that probably the digestibility of these proteins was reduced as the level of kaffirins in the sorghum increased. In growing-finishing pigs the level of kaffirins of sorghum did not compromise productive behavior, while the high level of tannins decreased daily feed intake. Diet and sex did not influence the expression of genes; however, the production phase influenced the expression of the eIF4e gene, since in the pigs in the finalization phase this gene had a greater expression. For the eIF2B1 gene an interaction between the phase and the diet consumed was presented. This gene was more expressed in pigs that consumed the HT-HK diet than those consumed the maize and HT-LK diet. Similarly, pigs consuming diets made with low tannin sorghums expressed more of this gene than those consumed the HT-LK diet. It is concluded that not only the level of tannins affects the productive variables, but the level of kaffirins also affects several morphophysiological variables, so these two components of sorghum should be considered together when formulating diets for pigs.

**(Key words:** tannins, kafirins, pigs, genes, enzymes)

## **DEDICATORIAS**

**A Dios y a su madre santísima, la Señora, quienes desde un principio estuvieron presentes en mi vida y a quienes agradezco su asistencia en diversos momentos durante el desarrollo de la presente tesis.**

**A mis padres Raúl y Silvia, por su ejemplo, sus bendiciones y por su apoyo invaluable siempre.**

**A mis hermanas y sobrinos, ya que deseo verlos siempre adelante, logrando sus metas y obteniendo lo que se propongan.**

**A Lupita y Omar, ya que siempre, en cualquier momento y situación han estado a mi lado, y han sido un excelente respaldo en mi vida diaria.**

**A mis amigos y compañeros de trabajo, en especial a Sara, Érika, Yanier, Pablo, Edna, Iris, Víctor, Aurora, Lety, por su apoyo en estos años.**

**A mis alumnos y a mis profesores, en especial a la Dra. Tércia, Dr. Gerardo, Dra. Araceli, Dra. Guadalupe y Dr. Konisgmar, ya que sin su apoyo y dedicación, esta tesis no hubiera sido posible.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de la Dra. Tércia Reis, el Dr. Gerardo Mariscal, la Dra. Araceli Aguilera, la Dra. Guadalupe Bernal y Dr. Konisgmar Escobar.**

**Mucho agradezco al Dr. Jorge Cantó y Dra. Teresa García, por su apoyo durante este proceso.**

**A todas y cada una de las personas del Laboratorio de Nutrición Animal, a mis alumnos, amigos y de manera especial a las secretarias Sandra, Juanita, Yola, Adis, Pueblito, y todas y cada una de ellas, que siempre estuvieron ahí en cada momento.**

**Al CONACYT por haberme becado durante los años que estuve realizando el trabajo doctoral, y a la Universidad Autónoma de Querétaro, por su invaluable apoyo. Al INIFAP por haber prestado sus instalaciones para la realización de las pruebas experimentales y al Laboratorio de Nutrición Animal por todo el apoyo brindado en estos años.**

## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>RESUMEN</b>	i
	<b>SUMMARY</b>	ii
	<b>DEDICATORIAS</b>	iii
	<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iv
	<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	v
	<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	vii
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	viii
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	3
	2.1 La alimentación en la producción porcina	3
	2.2 El uso del sorgo en la producción porcina	3
	2.2.1. Origen del sorgo, usos e importancia económica	3
	2.2.2. Composición del grano de sorgo	4
	2.2.2.1. Taninos del grano de sorgo	7
	2.2.2.2. Kafirinas del grano de sorgo	12
	2.3 Implicaciones de los componentes dietarios sobre la fisiología digestiva	18
	2.4 Crecimiento corporal del cerdo	20
	2.4.1. Proteínas del músculo esquelético	25
	2.4.2. Desarrollo muscular esquelético del cerdo	26
	2.4.3. Factores que afectan el desarrollo corporal y muscular esquelético del cerdo	28
	2.5 La alimentación y su relación con la expresión de genes	31
	2.6 Presencia de aminoácidos a nivel celular y síntesis de proteína muscular	33
	2.7 Inicio de la síntesis de proteínas en el músculo esquelético	34
	2.7.1. La vía mTOR en el inicio de la síntesis de proteínas y su relación con eIF4e	38
	2.7.2. eIF2B1 en el inicio de la síntesis de proteínas	44



	<b>2.8</b>	<b>Impacto de taninos y kafirinas en la expresión de los genes eIF2B1 y eIF4e</b>	<b>47</b>
<b>III.</b>		<b>HIPÓTESIS</b>	<b>49</b>
<b>IV.</b>		<b>OBJETIVOS</b>	<b>50</b>
	<b>4.1</b>	<b>Objetivo general</b>	<b>50</b>
	<b>4.2</b>	<b>Objetivos particulares</b>	<b>50</b>
<b>V.</b>		<b>METODOLOGÍA</b>	<b>51</b>
<b>VI.</b>		<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>52</b>
<b>VII.</b>		<b>IMPLICACIONES</b>	<b>53</b>
<b>VIII.</b>		<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>54</b>
<b>IX.</b>		<b>ANEXOS</b>	<b>77</b>
	<b>9.1</b>	<b>Anexo 1</b>	<b>77</b>
	<b>9.2</b>	<b>Anexo 2</b>	<b>86</b>
	<b>9.3</b>	<b>Anexo 3</b>	<b>96</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación y peso molecular de las kafirinas	14
2	Composición química aproximada del cerdo en diferentes pesos	24
3	Factores de la traducción de proteínas	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura del grano de sorgo	5
2	Taninos condensados e hidrolizables	8
3	Representación esquemática de la interacción taninos-PRP	12
4	SDS-PAGE de kafirinas totales del grano de sorgo sin reducir, extraídas con terbutanol al 60%	15
5	Micrografía electrónica de los cuerpos proteicos (s) y almidón (pb)	17
6	Algunos factores dietarios que afectan el aprovechamiento de la proteína dietética	19
7	Curva de crecimiento y composición química en cerdos castrados	22
8	Secreción de insulina en respuesta al consumo de alimento y algunos de los efectos metabólicos de esta hormona a nivel tisular	30
9	Esquema general de la traducción	35
10	Iniciación de la traducción en células eucariotas	37
11	Funciones y factores que afectan la actividad general de mTOR	40
12	Actividades de los complejos mTOR	43

## **I. INTRODUCCIÓN**

En septiembre del año 2015, los países reunidos en la Asamblea General de Naciones Unidas aprobaron la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible y se comprometieron a alcanzar 17 objetivos y cumplirlos para el año 2030. Dentro de las metas pactadas se comprometieron a eliminar el hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible (FAO y OPS, 2016).

La población mundial para el año 2050 será de aproximadamente 9 mil millones de seres humanos, por lo que la producción de carne se tendrá que incrementar en más de 200 millones de toneladas anuales, hasta alcanzar un total de 470 millones de toneladas. Lo anterior implica que se debe incrementar la disponibilidad de cereales para consumo humano y animal hasta llegar a una producción de 3 mil millones de toneladas para ese año (30% más de lo que se produce en la actualidad) y de forma global incrementar la producción de alimentos a más del 50% de lo que se elabora en este inicio del siglo XXI.

En este sentido, se prevé que a mitad del presente siglo, la producción agrícola total a nivel mundial se incremente en un 70% y que esto se logre mediante rendimientos más altos y por la intensificación de los cultivos. También se augura una ampliación de las tierras cultivables, sobretodo en África y América Latina. Para el caso particular de la producción de cereales, se producirán cultivos sembrados con semillas mejoradas o que presenten alguna característica para maximizar la producción de estos alimentos (FAO, 2009).

Existen cereales como el sorgo que tradicionalmente han sido usados principalmente para consumo animal en los países occidentales, sin embargo cerca del 40% de la producción mundial de este cereal se usa en la alimentación humana, sobretodo en África e India (Dendy, 1995; Rooney y Waniska, 2000).

En el caso particular de México, el sorgo es el segundo cereal que más se produce y es el que más se emplea en la industria ganadera nacional (68% de los cereales empleados) (Mariscal-Landín *et al.*, 2004), como lo es específicamente en la industria porcícola.

Para maximizar el rendimiento del cultivo del sorgo, se emplean mayormente variedades con niveles elevados de taninos, ya que estos componentes protegen al grano de enfermedades, le dan un sabor amargo que disminuye la depredación por parte de los pájaros, etc., pero en el proceso digestivo de los cerdos, tienen efectos detrimentales sobre el aprovechamiento de los nutrientes, ya que forman complejos con proteínas dietarias y endógenas, como las enzimas digestivas (Serrano *et al.*, 2009; Jezierny *et al.*, 2011), lo que ocasiona una menor absorción de nutrientes, y por lo tanto una mayor excreción de dichos nutrientes no digeridos y absorbidos hacia el medio ambiente. Históricamente, se ha analizado el papel que juegan los taninos en el comportamiento productivo de los cerdos, pero en años recientes también el papel que juegan las kafirinas del sorgo en este comportamiento productivo ha incitado interés, ya que las kafirinas son proteínas que afectan negativamente la calidad nutricional de este grano (Salinas *et al.*, 2006).

La manera en que los taninos y las kafirinas disminuyen la eficiencia en la utilización de los nutrientes es porque afectan la digestibilidad del almidón y de la proteína del sorgo (Selle *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). El sorgo además de su aporte energético puede proveer un tercio del requerimiento de los aminoácidos cuando se incluye en la dieta con un porcentaje de 60 a 80% (Black *et al.*, 2005; Doti *et al.*, 2014).

En la presente tesis se analizó cómo algunas características nutrimentales del sorgo afectan el aprovechamiento digestivo de sus nutrientes y modifican la expresión de genes relacionados con el inicio de la síntesis de proteínas en el músculo esquelético.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1. La alimentación en la producción porcina**

La producción porcina es una industria de transformación y como tal se debe lograr una adecuada eficiencia alimenticia, ya que el rubro que más impacta en los costos de producción es la alimentación, con un porcentaje que fluctúa entre el 57 y el 80% del costo total de producción, dependiendo si es un sistema tecnificado o semitecnificado (Gómez *et al.*, 2008; CGG, 2009).

Para que los cerdos crezcan de manera adecuada se deben proporcionar alimentos que cubran sus requerimientos nutricionales. Una definición de requerimiento es: la concentración de un nutriente en un alimento, la cual optimiza los parámetros productivos e involucra al genotipo, medio ambiente, factores sociales, sexo y la salud del cerdo (Lewis, 1992; Hahn *et al.*, 1995; Gómez *et al.*, 2007).

Considerando que la composición química del sorgo puede ser muy diversa, que es el cereal que más se emplea en la alimentación de los cerdos en México y que la producción porcina se ha incrementado en los últimos años, es por lo que a continuación se describen algunos aspectos y factores del sorgo que se deben considerar en la deposición de proteína muscular en el cerdo.

### **2.2. El uso del sorgo en la producción porcina**

#### **2.2.1. Origen del sorgo, usos e importancia económica**

El origen del sorgo es ancestral y se considera que surgió en el noreste de África y fue introducido a América en el siglo XVII (Bhattacharya *et al.*, 2011; Srinivasa y Ganesh, 2013). Su importancia radica en que, por sus características químicas, puede suplir en los usos de la alimentación humana y animal a algunos cereales como el trigo y maíz.

La palabra sorgo procede del verbo latino *surgere*, por la capacidad que tiene de alcanzar una altura elevada (Pérez *et al.*, 2010). Además, es un cereal que crece de forma adecuada en climas secos (Chamba *et al.*, 2005), siendo un excelente cereal en términos de resistencia a la sequía (Taylor *et al.*, 2006).

Algunos usos industriales del sorgo son: producción de almidón, dextrosa, miel de dextrosa, aceites comestibles y bebidas, colorantes, cosméticos, papel, productos farmacéuticos, confituras, etanol, ácido acético, metano, butanol y ácido láctico (Pérez *et al.*, 2010; Chuck-Hernández *et al.*, 2011; Srinivasa y Ganesh, 2013), e incluso puede ser un cereal con el que se elaboren tortillas (Taylor *et al.*, 2006).

Es un cereal que se emplea en la alimentación animal, ya que es una fuente de energía, al estar constituido por aproximadamente 70% de almidón y puede contener hasta 13.7% de proteína, pero su inclusión en la dieta puede ocasionar un menor desempeño productivo en comparación con otros cereales como el maíz (Grabouski *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 2013).

El sorgo ocupa el quinto lugar mundial en los granos de mayor importancia económica después del trigo, maíz, arroz y cebada, y se considera un cultivo alimenticio primario en los trópicos semiáridos de Asia, África y Sudamérica (Wong *et al.*, 2009; Srinivasa y Ganesh, 2013).

Estados Unidos, México, Nigeria, Sudán e India produjeron en 2014 aproximadamente la mitad de la producción mundial de sorgo (FAOSTAT, 2016).

### **2.2.2. Composición del grano de sorgo**

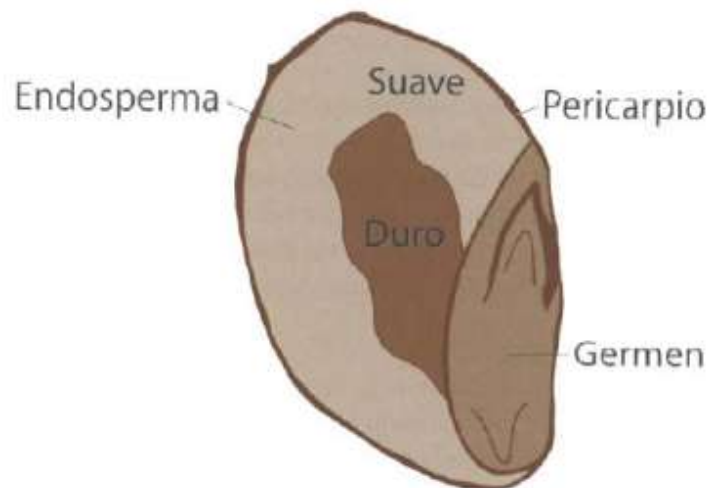
El grano de sorgo tiene un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm (Ibar, 1984) y se compone de tres partes: pericarpio, epidermis o capa externa; endospermo o tejido de almacenamiento, y el germen, representando cada una de ellas el 6, 84 y 10%, respectivamente (Gómez *et al.*, 2009a) (Figura 1).

El pericarpio o epidermis consta de tres capas, conteniendo pigmentos y ceras la más externa de ellas (epicarpio), la capa media (mesocarpio) se constituye por gránulos de almidón incluidos en una densa red proteica y la capa interna

(endocarpio) está formada por células en forma de cruz y tubulares. La testa es una capa pigmentada ubicada debajo del pericarpio y presente en algunas variedades de sorgo.

El endospermo o tejido de almacenamiento se compone mayormente de proteínas y carbohidratos y se conforma por una capa de aleurona y porciones de endospermo córneo y harinoso. Alrededor del 90% del almidón y 80% de la proteína total del grano se localizan en el endospermo (Gómez *et al.*, 2009a). La capa de aleurona se localiza inmediatamente debajo del pericarpio y consiste de pequeñas células densas con un contenido relativamente alto de aceite y proteína. El endospermo córneo se localiza debajo de la aleurona y está constituido por células que contienen almidón y que se entremezclan con una gruesa matriz proteica compuesta por los cuerpos proteicos. El endospermo harinoso se localiza en el centro del grano y está rodeado por el endospermo córneo (Rooney y Clark, 1968).

Figura 1. Estructura del grano de sorgo (Reed, 2005)



El germen se encuentra firmemente incrustado en el grano y contiene el embrión de la nueva planta y sus estructuras asociadas. Posee el 75% del extracto etéreo del grano (Rooney y Clark, 1968; Farías, 2005).

La composición del germen es de 28% de aceite, 19.5% de proteína y 10% de cenizas (Wall y Blessin, 1969).



El almidón del sorgo, mayor componente del grano, contiene amilosa (alrededor de 30%) y amilopectina (alrededor de 70%) (Serna-Saldivar y Rooney, 1995; Svihus *et al.*, 2005). Los gránulos de almidón en el sorgo se encuentran envueltos por una matriz proteica de kafirinas que actúan como una barrera físico-química que limita la actividad enzimática de la amilasa (Wong *et al.*, 2009). Factores que afectan la digestibilidad del almidón del sorgo son la proporción amilosa:amilopectina, la longitud de la cadena y el grado de ramificación de la amilopectina, el tamaño de los gránulos del almidón y su relación con las proteínas, lípidos y minerales (Wolter *et al.*, 2013; Doti *et al.*, 2014). El contenido de amilosa también está correlacionado positivamente con la dureza del endospermo (Cagampang y Kirleis, 1984). La proteína es el segundo mayor componente (Serna-Saldivar y Rooney, 1995). Del total de ácidos grasos, los que se encuentran en mayor concentración son el ácido linoleico, oleico y palmítico (Osman *et al.*, 2000). La fibra del sorgo se encuentra principalmente en el pericarpio y en las paredes celulares del endospermo y está formado básicamente por celulosa y glucuronoarabinoxilanos, respectivamente (Verbruggen *et al.*, 1993), aunque también contiene  $\beta$ -glucanos, lignina, pectinas y gomas (Hoseney, 1994).

La composición química del sorgo es muy variable, por lo que de igual manera su valor nutritivo puede cambiar entre las diversas variedades (Mossé *et al.*, 1988). Los valores de proteína cruda del grano de sorgo reportados en la literatura oscilan entre 5.44 a 15%, los taninos varían de 0.02 o no detectables a 6.32% y la fibra detergente neutro entre 9.1 a 15.7%. La diferencia de estos valores se debe a la variedad genética y a las condiciones agroecológicas (clima, suelo, nivel de fertilización, etc.) en las que se produjeron los sorgos (Ramírez *et al.*, 2005; Salinas *et al.*, 2006). La eficiencia en la digestión de las dietas elaboradas a base de granos de sorgo dependerá en parte de la composición química de este grano.

Los alimentos vegetales con mayor contenido de proteínas de reserva, tienen proteínas de menor calidad debido a que la concentración de los aminoácidos esenciales disminuye. El perfil de proteínas (albúminas, globulinas, prolaminas y

glutelinas) incide en el perfil de aminoácidos y en la digestibilidad de la proteína. La calidad de la proteína de la materia prima, como lo es el sorgo, disminuye conforme se incrementa el contenido de proteína (Gómez *et al.*, 2009a).

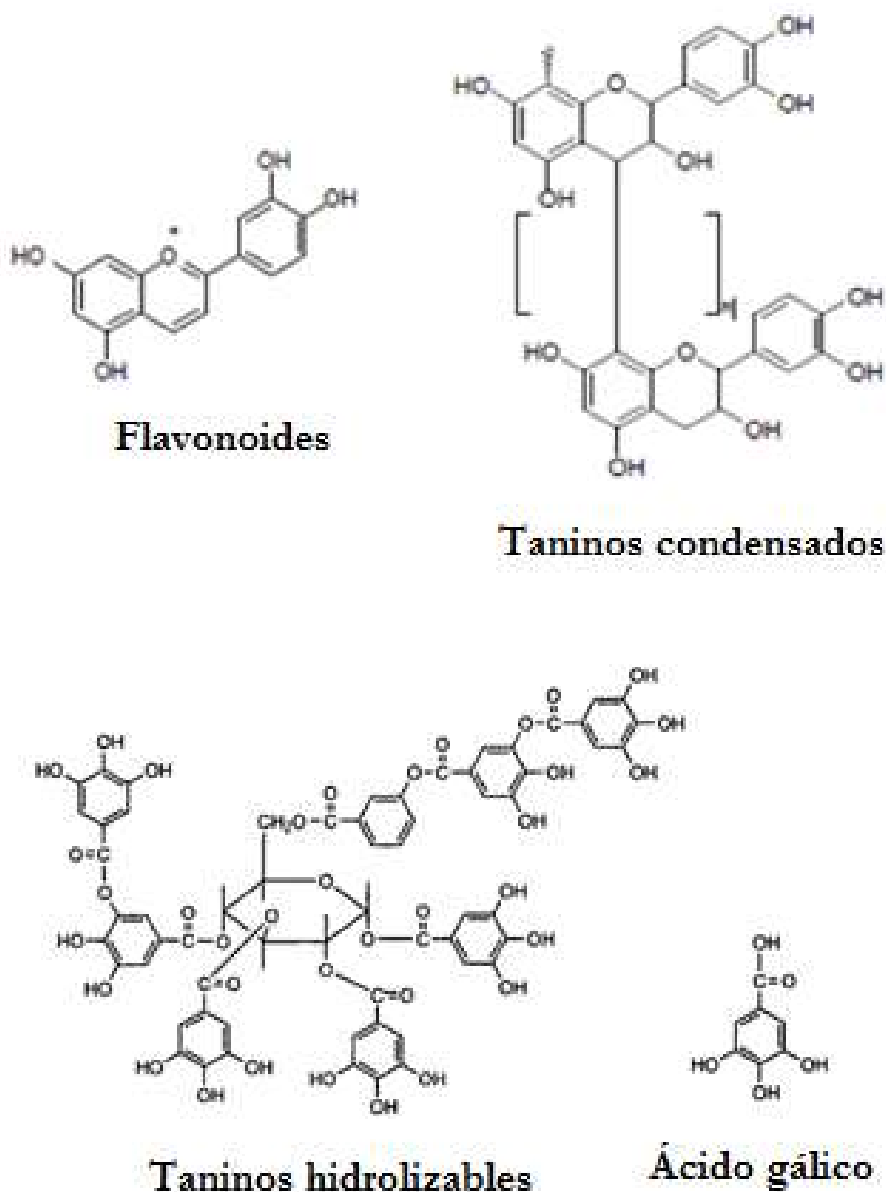
Dentro de los componentes químicos a tomar en cuenta y que inciden en el proceso digestivo de las dietas elaboradas con sorgo se encuentran los taninos (Jansman *et al.*, 1993; Duodu *et al.*, 2002; Emmambux and Taylor, 2003; Serrano *et al.*, 2009) y las kafirinas (Elkin *et al.*, 1996; Mariscal-Landín *et al.*, 2010), pudiendo afectar el comportamiento productivo de los animales que consumen estos cereales.

#### **2.2.2.1. Taninos del grano de sorgo**

Los taninos son compuestos polifenólicos de alto peso molecular que se encuentran en el pericarpio del grano, y su nombre proviene del uso que se les ha dado para curtir las pieles de los animales (del inglés *tanning*) (Avellaneda, 1999). Algunos autores describen que la cubierta del sorgo puede presentar una amplia variedad de colores dependiendo de la concentración de taninos (Belmar y Nava, 2005), aunque realmente el color del pericarpio del grano no es un indicador confiable del contenido de taninos (Dykes y Rooney, 2006). El sorgo es un cereal único debido a la gran cantidad de taninos que puede contener, aunque no todas las variedades contienen este factor antinutricional (Duodu *et al.*, 2003). Los sorgos se pueden clasificar en tres categorías dependiendo de su genotipo y contenido de taninos (Asquith *et al.*, 1983): los sorgos tipo I no tienen pigmentada la testa y no contienen taninos; los sorgos tipo II tienen la testa pigmentada y contienen taninos condensados, mientras que los sorgos tipo III (antipájaros) contienen gran cantidad de taninos que se encuentran no sólo en la testa sino también en el pericarpio (Dykes y Rooney, 2006). La función de los taninos en la planta es retardar el crecimiento de las semillas debido a la inhibición de la degradación del almidón y proteínas. Los taninos protegen al grano del sorgo de la depredación de los pájaros y de las infestaciones por hongos (Reyes *et al.*, 2000).

Por su estructura y reactividad hacia los agentes hidrolíticos los taninos se clasifican en dos grupos: los taninos hidrolizables o ácidos tánicos y los taninos condensados (Reed, 1995; Avellaneda, 1999; Belmar y Nava, 2005; Lee *et al.*, 2010) (Figura 2). En el sorgo, los taninos generalmente están presentes en su forma condensada y son conocidos como antocianidinas, proantocianidinas o leucoantocianidinas (Reyes *et al.*, 2000; Fayyaz y Naser, 2015).

Figura 2. Taninos condensados e hidrolizables (modificado de Avellaneda, 1999; Shahidi y Naczki, 2004)



Los ácidos tánicos son fácilmente hidrolizables por ácidos o por enzimas, además de que son más solubles en agua que los taninos condensados. Son ésteres del ácido gálico y del ácido elágico de centros moleculares que consisten en polialcoholes, tales como los azúcares y los fenoles como la catequina. El  $\beta$ -penta-O-galoil-D-glucosa es el ácido tánico y es el compuesto modelo para los taninos hidrolizables. Además, se pueden clasificar por el producto de la hidrólisis, ya que los galotaninos producen ácido gálico y glucosa y los elagitaninos producen ácido elágico y glucosa. También producen reacciones de condensación, por lo que el término de taninos condensados puede ser confuso (Reed, 1995).

Los taninos condensados (proantocianidinas) se encuentran en el sorgo y no son susceptibles a hidrólisis. Son polímeros flavonoides (polímeros de enlaces de flavo-3-ol mediante un enlace de carbón interflavano que no lo hace susceptible a hidrólisis), pero pueden ser degradados oxidativamente en ácidos fuertes para producir antocianidinas (Reed, 1995; Avellaneda, 1999; Belmar y Nava, 2005).

Ramírez *et al.* (2005) describen que en México, el 91.7% de muestras analizadas contenía niveles de taninos inferiores al 1.5% y sólo un 1.86% de las muestras analizadas contenían valores superiores al 3.9% de taninos.

El sorgo puede contener mayor contenido de proteína cruda que el maíz, sin embargo, su proteína es menos digestible de acuerdo a la cantidad de taninos presentes. Fialho *et al.* (2004) indican que el sorgo bajo en taninos puede ser utilizado para reemplazar el maíz en dietas para cerdos, sin afectar el consumo, la ganancia de peso y el índice de conversión alimenticia, aunque Gómez *et al.* (2009a) indican que generalmente el valor nutricional del maíz es mayor al del sorgo, aún comparado con sorgos de alta digestibilidad, pero que el sorgo puede usarse de manera efectiva en las dietas de todas las etapas productivas del cerdo, sólo que hay que formular las dietas ajustando los niveles de energía y de aminoácidos empleando los coeficientes de digestibilidad ileal aparente o estandarizada de aminoácidos.

El aprovechamiento de los nutrientes consumidos está relacionado con la actividad enzimática durante el proceso digestivo, dicha actividad está influenciada por condiciones físico-químicas de la digesta y por los componentes dietarios (Jansman *et al.*, 1994). Los taninos forman complejos con polisacáridos, proteínas dietarias y proteínas endógenas. Los taninos se unen a las enzimas digestivas, aminoácidos, ácidos grasos, hierro y ácidos nucleicos, afectando la utilización de la energía y de la proteína, debido a una disminución de la actividad de las enzimas digestivas, lo que ha sido validado en estudios *in vitro* e *in vivo* (Jansman *et al.*, 1994; Reed, 1995; Fernández-Quintela *et al.*, 1998; Reyes *et al.*, 2000; Santos-Buelga y Scalbert, 2000; Serrano *et al.*, 2009; Jezierny *et al.*, 2011).

Los taninos del sorgo son capaces de unirse y precipitar cantidades de proteínas en al menos 12 veces su propio peso. Dichas interacciones se dan mediante puentes de hidrógeno y asociaciones no polares hidrofóbicas (Butler *et al.*, 1984).

En variedades de sorgo con alto contenido de taninos, la formación de complejos proteína-taninos es la mayor limitante en la utilización de dichas proteínas (Chibber *et al.*, 1980).

La inclusión dietaria de niveles elevados de taninos reduce la ganancia de peso corporal y el consumo de alimento, ya que disminuyen la palatabilidad debido a sus propiedades astringentes (Jezierny *et al.*, 2010); altera la eficiencia en la conversión alimenticia y reduce la digestibilidad aparente de la proteína cruda en cerdos (Jansman *et al.*, 1994; Reyes *et al.*, 2000; Vitti *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010). Mariscal-Landín *et al.* (2004) observaron un efecto detrimental de los taninos sobre la digestibilidad de las proteínas, cuando éstos se encuentran en más de 4% en el grano de sorgo en cerdos de más de 50 kg de peso vivo (PV).

Además, los taninos disminuyen la digestibilidad de la mayoría de los aminoácidos esenciales, debido a la formación de complejos con las membranas de la mucosa.

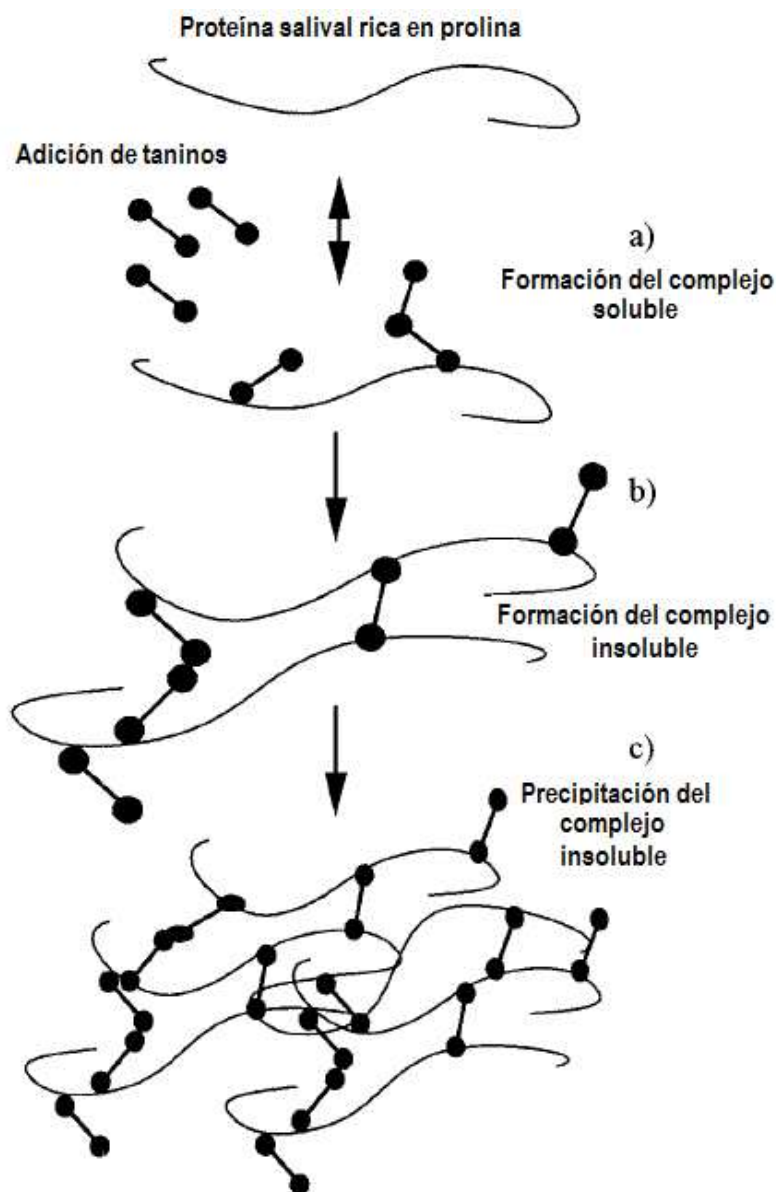
Por otro lado, se reporta que los taninos hidrolizables podrían causar efectos tóxicos a nivel sistémico, sobretodo en el hígado (Belmar y Nava, 2005), aunque

faltan estudios en cerdos, ya que la mayoría de los resultados publicados hacen referencia a ratas y pollos, donde se puede observar hígado graso, necrosis hepática y renal. Respecto a los efectos tóxicos sistémicos de los taninos condensados, no se conoce lo suficiente, ya que se asume que son relativamente resistentes a la hidrólisis en el intestino y pasan por él sin absorberse por las membranas intestinales (Jansman *et al.*, 1993). El consumo de altos niveles de taninos, incluso puede causar la muerte del animal (Garg *et al.*, 1992).

Otro ejemplo de los efectos que tienen los taninos en el proceso digestivo es que la presencia de este factor antinutricional en la alimentación de cerdos se ha asociado a un aumento en la excreción endógena de N al inicio del proceso digestivo, ya que en la saliva se secreta una glicoproteína ácida rica en prolina (PRP) (Jansman *et al.*, 1993) gracias al efecto astringente de los taninos presentes en los granos de sorgo (Jezierny *et al.*, 2010). La PRP constituye el 70% de las proteínas salivales (Charlton *et al.*, 2002). Dicha propiedad astringente se da por la formación del complejo tanino-PRP (Reed, 1995) que se precipita (Charlton *et al.*; 2002). La PRP contiene 40% de prolina y 20% de glicina y sirve como la primera línea de defensa ante la presencia de taninos en la dieta (Mehansho *et al.*, 1985), ya que los taninos muestran una particular preferencia por unirse al aminoácido prolina. En la Figura 3 se muestra un esquema de las fases en que ocurre la unión y precipitación de los polifenoles al unirse a las proteínas salivales ricas en prolina. Se observa que inicialmente se forma un complejo soluble (a), posteriormente al unirse más polifenoles, dos péptidos solubles se unen mediante interacciones polifenoles-proteínas y dicho complejo se vuelve insoluble (b), finalmente los complejos insolubles forman agregados que precipitan (c) (Charlton *et al.*, 2002). Otra de las proteínas secretadas en la saliva y a las cuáles se unen los taninos, es la histatina, que contiene una alta proporción del aminoácido histidina (Naurato *et al.*, 1999). De esta manera, los efectos detrimentales de los taninos en la digestión enzimática estomacal e intestinal disminuyen. La arginina es otro de los aminoácidos cuya digestibilidad ileal se ve disminuida por la presencia de los taninos, porque dicho aminoácido

potencializa la unión entre la proteína y los taninos formando un sitio adicional de interacción (Charlton *et al.*, 2002).

Figura 3. Representación esquemática de la interacción taninos-PRP  
(modificado de Charlton *et al.*, 2002)



#### 2.2.2.2. Kafirinas del grano de sorgo

Avellaneda (1999) y Bansal *et al.* (2008) describen que las proteínas del grano de sorgo se han clasificado según su solubilidad en albúminas (solubles

en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en alcohol) y glutelinas (solubles en soluciones básicas). Las prolaminas son las proteínas más abundantes en los granos de cereales, por lo que son una fuente importante de proteína para los humanos y el ganado (Bansal *et al.*, 2008). Las principales prolaminas del sorgo son las kafirinas, que son las proteínas más abundantes del grano de sorgo, conformando el 70-80% de las proteínas del endospermo (Mazhar *et al.*, 1993; Nunes *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2009) y el 40-55% de las proteínas totales en el grano maduro, además de que contienen elevados niveles de prolina y glutamina (Bansal *et al.*, 2008; De Mesa-Stonestreet *et al.*, 2010), que en conjunto suman el 30% de los residuos totales en las fracciones totales de kafirinas (Belton *et al.*, 2006). Johns y Brewster (1916) fueron los primeros en identificar y acuñar el nombre de kafirinas.

El contenido de kafirinas en el grano de sorgo depende de factores agronómicos y genéticos (Hicks *et al.*, 2001). Basados en diferencias de solubilidad, de peso molecular, de estructura y de composición de aminoácidos (Bansal *et al.*, 2008), las kafirinas se han clasificado en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Cuadro 1; Figura 4). Para separar y analizar dichas fracciones, se pueden emplear geles de electroforesis (Hamaker *et al.*, 1995; El Nour *et al.*, 1998; Duodu *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2005) y por lo tanto, la técnica de *Western blot* también se puede utilizar para analizar las diversas fracciones empleando anticuerpos específicos (Mazhar y Chandrashekar, 1995; Wong *et al.*, 2010).

Las kafirinas  $\alpha$  representan 66-84%, las kafirinas  $\beta$  8-13%, las kafirinas  $\gamma$  9-21% de las kafirinas totales (Chamba *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2009; De Mesa-Stonestreet *et al.*, 2010) y las kafirinas  $\delta$  se encuentran en bajos niveles y no han sido caracterizadas a nivel de proteína (De Mesa-Stonestreet *et al.*, 2010; Pontieri *et al.*, 2013).

Las kafirinas se encuentran formando cuerpos proteicos (Duodu *et al.*, 2003) que son acúmulos proteicos circulares con un diámetro promedio entre 0.4 a 2  $\mu\text{m}$  que se encuentran en el endospermo del grano (Selle *et al.*, 2010). Las kafirinas  $\alpha$  se localizan en la parte central del cuerpo proteico (Oria *et al.*, 1995; Ioerger *et al.*, 2007; De Mesa-Stonestreet *et al.*, 2010), mientras que las kafirinas



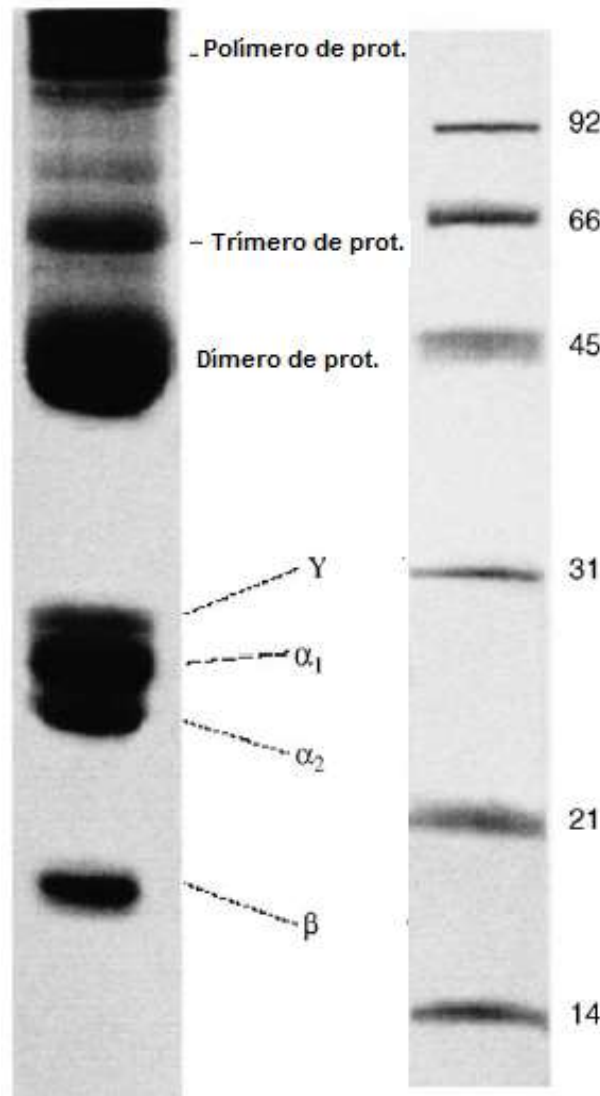
$\beta$  y las kafirinas  $\gamma$ , se encuentran localizadas en la periferia del cuerpo proteico o como una inclusión en el mismo (Chandrashekar y Mazhar, 1999; Taylor *et al.*, 2007). Sin embargo, Selle *et al.* (2010) describen que no en todas las variedades de sorgo las kafirinas  $\alpha$  son las más abundantes, lo cual impacta en el perfil de aminoácidos dependiendo de la proporción de las fracciones de kafirinas en el grano de sorgo; el contenido de aminoácidos básicos (arginina, histidina y especialmente lisina) está en bajas concentraciones en las diversas fracciones de kafirinas. La concentración de metionina es elevada en las kafirinas  $\beta$ , mientras que las kafirinas  $\gamma$  son ricas en prolina y cisteína.

Cuadro 1. Clasificación y peso molecular de las kafirinas

<b>Autor</b>	<b>Kafirinas <math>\alpha</math> (kDa)</b>	<b>Kafirinas <math>\beta</math> (kDa)</b>	<b>Kafirinas <math>\gamma</math> (kDa)</b>	<b>Kafirinas <math>\delta</math> ( kDa)</b>
Mazhar y Chandrashekar, 1995	24-28 y 22	19	27	-
Hamaker <i>et al.</i> (1995); Oria <i>et al.</i> (1995); Duodu <i>et al.</i> (2002)	23 y 25	16, 18, 20	28	-
Chandrashekar y Mazhar, 1999	23 y 25	19	27	-
Emmambux y Taylor (2003); Nunes <i>et al.</i> (2005)	23 y 25	20	28	-
Belton <i>et al.</i> , 2006	26-27	18.74	20.2	12.9
Bansal <i>et al.</i> , 2008	23 y 25	15, 17 y 18	28	-
Wong <i>et al.</i> , 2009	23 y 25	20	28	-
De Mesa-Stonestreet <i>et al.</i> , 2010	23 y 25	18	20	13

Una alta proporción de las kafirinas  $\alpha$  totales son extraíbles en solución alcohólica como una mezcla de monómeros, oligómeros y polímeros, pero algunas subunidades están presentes en polímeros insolubles y sólo se pueden extraer en condiciones de reducción (Belton *et al.*, 2006).

Figura 4. SDS-PAGE de kafirinas totales del grano de sorgo sin reducir, extraídas con terbutanol al 60% (modificado de Belton *et al.*, 2006)



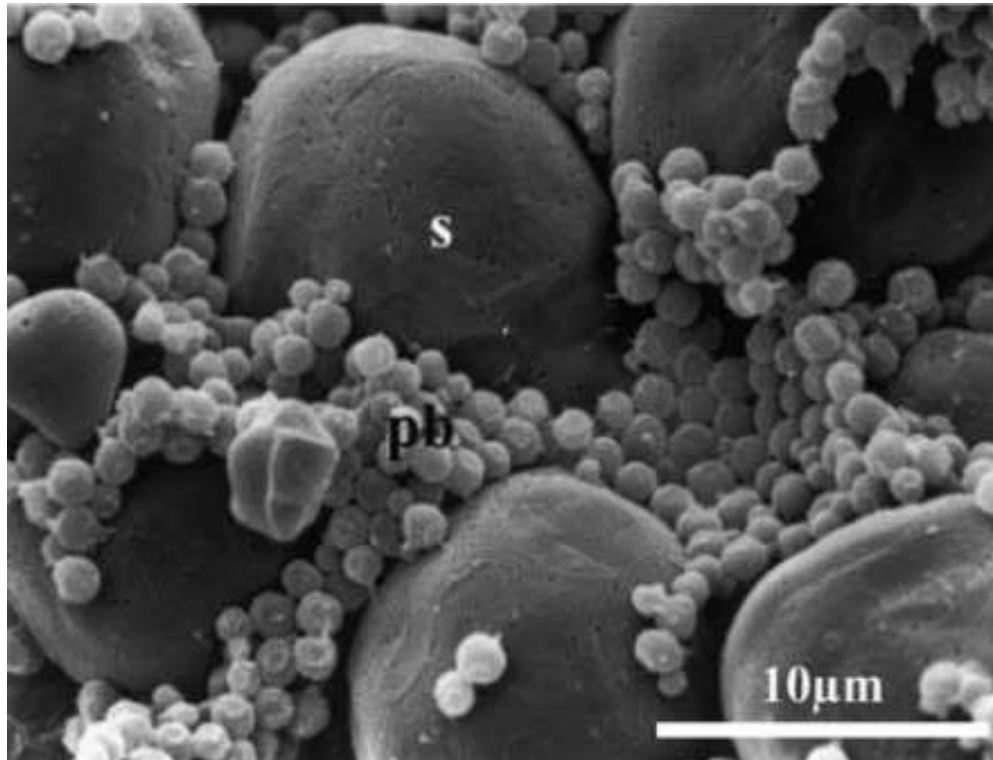
Elkin *et al.* (1996) mencionan que la baja digestibilidad proteica del sorgo se presenta aún en variedades con bajo contenido de taninos y Oria *et al.* (2000) mencionan que dichos sorgos son los que más se cultivan en el mundo, por lo que la naturaleza o perfil de las proteínas es uno de los factores responsables de la digestibilidad baja del grano de sorgo. La cantidad y calidad nutricional de las proteínas del grano de sorgo dependen principalmente de la concentración de kafirinas (Salinas *et al.*, 2006). Los factores que contribuyen a la pobre digestibilidad del sorgo se pueden dividir en factores endógenos y exógenos (Duodu *et al.*, 2003). Existen factores exógenos como interacciones de las

proteínas del sorgo con componentes no proteicos como polifenoles, polisacáridos no amiláceos, almidón, fitatos y lípidos; así como factores endógenos como la naturaleza de la proteína y su organización dentro del grano de sorgo (Fernández-Quintela *et al.*, 1998; Jondreville *et al.*, 2001; Duodu *et al.*, 2003) que también se deben considerar para entender y comparar la digestibilidad de los nutrientes del grano de sorgo contra otros granos de cereales.

La estructura u organización de las proteínas del grano de sorgo es uno de los principales factores que afectan la digestibilidad de este cereal (Duodu *et al.*, 2003). Posterior a su síntesis, las kafirinas se dirigen al retículo endoplásmico rugoso donde son acumuladas y empaçadas en cuerpos proteicos (Figura 5) de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Taylor *et al.*, 1985). Hicks *et al.* (2001) indican que la ubicación de los diferentes tipos de kafirinas en los cuerpos proteicos y el tipo de kafirina afectan la digestibilidad proteica del sorgo. Las kafirinas  $\alpha$ , debido a su ubicación en el interior y parte central del cuerpo proteico, además de ser las más abundantes, presentan dificultad para ser hidrolizadas por las enzimas digestivas, a diferencia de las kafirinas  $\gamma$  y  $\beta$  que se encuentran en la porción periférica de dichos cuerpos proteicos (Oria *et al.*, 1995, 2000). De igual manera se debe considerar que las kafirinas son proteínas hidrofóbicas (Xiao *et al.*, 2015), lo que indica que son menos solubles que las proteínas presentes en otros cereales.

Las kafirinas contienen grandes cantidades de prolina, aminoácido con gran afinidad para unirse a los taninos y fomentar la formación de los complejos taninos-kafirinas (Taylor *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 1997; Piluzza *et al.*, 2013), por lo que Taylor *et al.* (2007) y De Mesa- Stonestreet *et al.* (2010) describen que los taninos del sorgo se unen preferentemente a las kafirinas  $\gamma$ , más que a las kafirinas  $\alpha$  y kafirinas  $\beta$ , debido a su alto contenido de prolina. Otra afectación en el proceso digestivo por el tipo de kafirina es el hecho de que las kafirinas  $\gamma$  son resistentes a la acción de la enzima pepsina, lo que disminuye su digestibilidad y ocasionan una mayor secreción de tripsina (Mariscal-Landín *et al.*, 2004).

Figura 5. Micrografía electrónica de los cuerpos proteicos (s) y almidón (pb)  
(Duodu *et al.*, 2002)



Las kafirinas también forman dímeros, trímeros y polímeros (Figura 4) (Nunes *et al.*, 2005; Belton *et al.*, 2006) afectando la capacidad de hidrólisis de la enzimas digestivas. También, el proceso de digestión enzimática se da en un ambiente acuoso, al ser las kafirinas las proteínas más abundantes del sorgo y solubles en alcohol, estas proteínas son menos accesibles al proceso digestivo (Duodu *et al.*, 2003). Así, las kafirinas son las últimas proteínas del sorgo en ser digeridas (Hamaker *et al.*, 1986).

Además, se debe considerar que las kafirinas son las proteínas más abundantes del sorgo y son consideradas de una baja calidad nutricional, muy heterogéneas, deficientes en aminoácidos básicos especialmente en lisina, así como en treonina y triptófano, ricas en leucina, prolina y ácido glutámico (Salinas *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013). Concentraciones altas de kafirinas en el grano de sorgo afectan negativamente la energía metabolizable (Salinas *et al.*, 2006), la digestibilidad de la proteína y el almidón (Serna-Saldivar y Rooney, 1995).

En resumen, sorgos con elevada concentración de kafirinas podrían ser menos digestibles que aquellos con una baja concentración de ellas, por lo que un consumo elevado de kafirinas afectará la disponibilidad de nutrientes como aminoácidos, pudiendo afectar, al igual que lo taninos, la expresión de genes como el eIF2B1 y eIF4e relacionados con el inicio de la síntesis de la proteína a nivel del músculo (Liu *et al.*, 2014), en cerdos en crecimiento-finalización.

### **2.3. Implicaciones de los componentes dietarios sobre la fisiología digestiva**

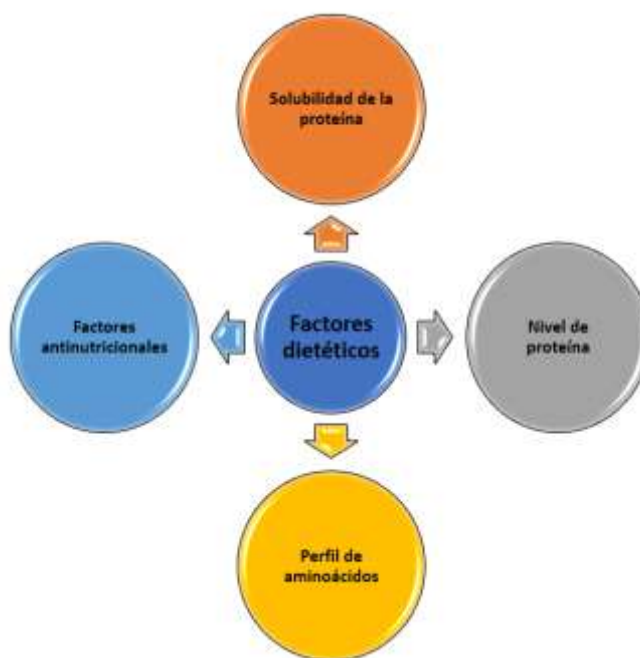
Además de la cantidad de proteína que se aporta en la dieta, es importante considerar el perfil de los aminoácidos, ya que el uso y necesidades de los aminoácidos cambian de acuerdo a la edad del animal (Mejía *et al.*, 2007). Por ejemplo, en la etapa de mantenimiento de los sementales, las necesidades de lisina pasan a ser menores que en la etapa de crecimiento y la remoción de lisina de la dieta de cerdos adultos tiene una mínima influencia en el balance de N cuando se compara con la remoción de los aminoácidos azufrados y de la treonina (Millward, 1997). La elevada necesidad de treonina se relaciona con la síntesis de mucinas en el intestino; la de los aminoácidos azufrados (principalmente cisteína) con la síntesis de proteína del tejido epitelial como el pelo, epidermis y pezuñas (Baker, 2005).

Como ya se mencionó anteriormente, dentro de los componentes químicos que pueden afectar el proceso digestivo se encuentran los taninos condensados, que reducen la disponibilidad biológica y la digestibilidad de uno o más nutrientes, ocasionando disminución del consumo de alimento y de la función digestiva (D'Mello, 2000). También es importante considerar aspectos propios de la proteína como la solubilidad de las mismas, ya que en el caso de cereales, estos son ricos en prolaminas (en el sorgo llamadas kafirinas), que son solubles en alcohol y pueden afectar la digestibilidad de sus proteínas (Figura 6). La presencia de taninos y kafirinas en el sorgo puede ocasionar un incremento de la

secreción de proteínas endógenas (sintetizada en el organismo) como enzimas y mucinas, más que el trigo, maíz, cebada y centeno (Jondreville *et al.*, 2001).

Los múltiples aspectos que afectan la funcionalidad del tracto gastrointestinal (TGI) abarcan no sólo a los factores antinutricionales, sino también el proceso digestivo (grado y sitio de digestión, actividad microbiana), proceso de absorción (grado, sitio y tipo de transportadores), procesos secretorios (enzimas digestivas, moco, inmunoglobulinas), actividad metabólica mucosa (masa de tejido, recambio, proliferación, reparación, respuesta inmune) y tipo de nutrientes suministrados a la mucosa (suministro del lumen y por sangre arterial).

Figura 6. Algunos factores dietarios que afectan el aprovechamiento de la proteína dietética



Cerca del 10% de la síntesis total de proteína en la mucosa del TGI se relaciona con la síntesis neta de proteína de la mucosa y el resto es secretada al lumen como enzimas digestivas, moco, inmunoglobulina y células de descamación. Por tanto, los factores nutricionales que estimulan la función secretora del TGI pueden afectar la tasa de utilización de los nutrientes.

Los tejidos de la pared del TGI tienen una actividad metabólica relativamente elevada comparada con otros tejidos corporales. Comparado con la proteína en

el músculo esquelético, la tasa de síntesis de proteína y la tasa de degradación de proteína en el TGI es mucho más elevada. Una amplia fracción de las secreciones endógenas del TGI serán digeridas y reabsorbidas por la pared del TGI (reciclaje); sin embargo, los procesos de síntesis y absorción tienen un costo energético, y por tanto de nutrientes (Bannink *et al.*, 2006).

Los tejidos del TGI de cerdos en crecimiento emplean 50% de los aminoácidos dietarios, incluyendo 30-50% de lisina, leucina y fenilalanina, así como el 60% de treonina (Wang *et al.*, 2007). Inclusive Burrin *et al.* (2000) mencionan que del 60 al 85% de la treonina dietaria se utiliza en el intestino.

Entre menos se aproveche digestivamente la dieta por parte de los animales, la eliminación de desechos por parte del animal al medioambiente será mayor (Gómez *et al.*, 2007) y dadas las condiciones medioambientales actuales es un factor que se debe considerar en la industria porcina.

En cerdos se puede disminuir la cantidad de proteína dietaria si se añaden aminoácidos cristálino, por cada unidad porcentual que se reduce la proteína cruda, las pérdidas totales de nitrógeno (excremento y orina) se pueden reducir en aproximadamente 8% (Kerr y Easter, 1995; Anindo *et al.*, 2015).

Los factores ligados al animal y al alimento influyen directamente sobre la composición química de las excretas, ya que la excreción corresponde a la proporción de un nutrimento contenido en el alimento que no es retenido por el animal (Dourmand, 1991); la cantidad retenida depende de la composición del alimento y de la capacidad del animal en depositar o fijar los diferentes nutrimentos, principalmente el nitrógeno y fósforo (Gómez *et al.*, 2007).

## **2.4. Crecimiento corporal del cerdo**

En el proceso de producción de carne, dependiendo de la especie animal y de otros factores, de 50 a 70% de los costos de producción se relacionan con la alimentación, por lo que se debe maximizar la eficiencia en la conversión alimenticia. La conversión alimenticia representa la interacción entre la tasa de

ganancia corporal, la naturaleza del tejido depositado y las ineficiencias de los procesos digestivos (Garcés, 2010; NRC, 2012).

El crecimiento es el proceso esencial de la industria de la producción de carne y es un proceso normal de incremento de tamaño de un órgano, producido por la acumulación de tejidos similares en composición a los del tejido original. El incremento del tamaño se logra por hipertrofia (aumento del tamaño de las células existentes) o por hiperplasia (producción o multiplicación de nuevas células) (Garcés, 2010).

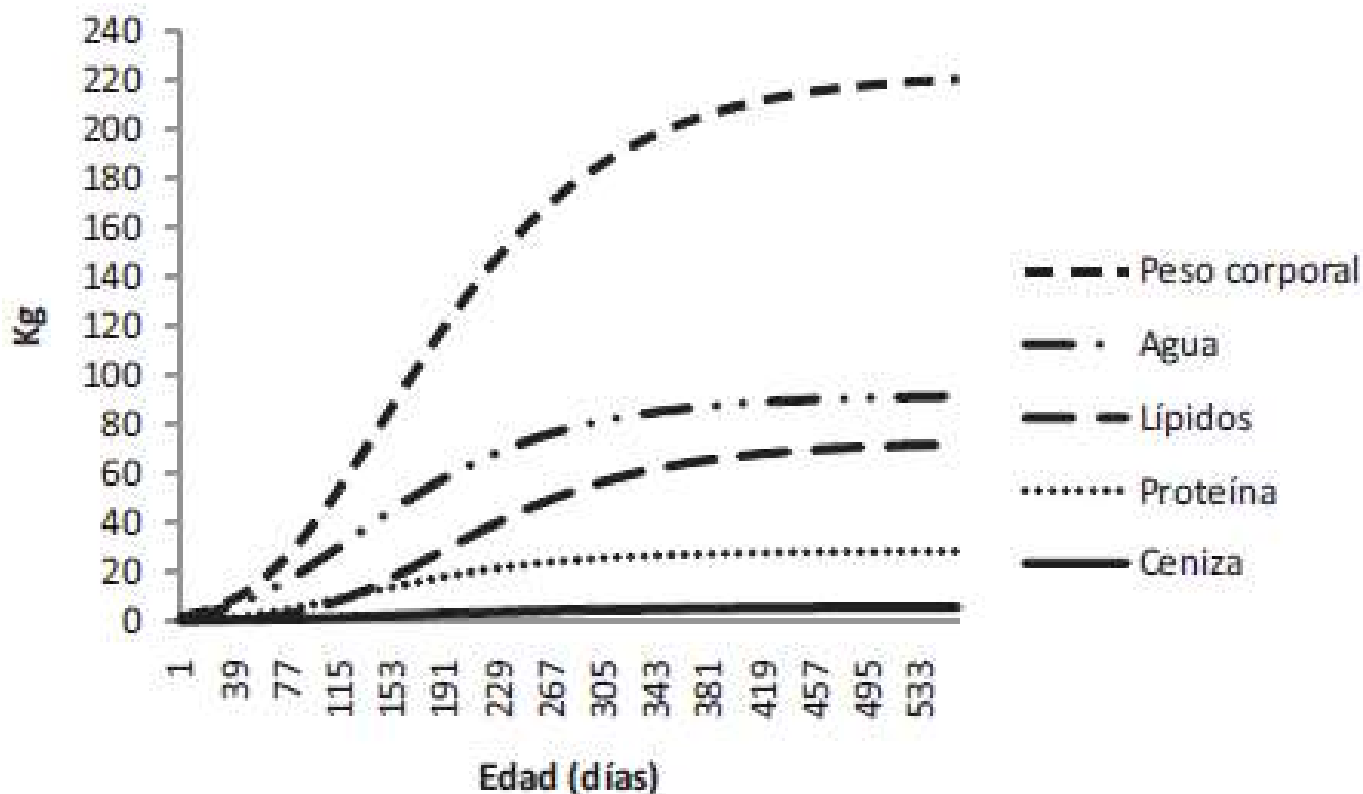
La síntesis de proteína es responsable de los procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación prenatal y posnatal. Tanto la síntesis y la degradación de proteína tisular son dos procesos opuestos y complejos, además de que están controlados por una variedad de señales hormonales, físicas y químicas que tienen como resultado el crecimiento de los animales inmaduros o el mantenimiento del balance proteico en el animal adulto. El desbalance que resulta de ajustes en la síntesis o degradación es la causa de la ganancia o pérdida de proteína tisular (Mortimore y Kadowaki, 2001; Garcés, 2010; Yin *et al.*, 2013).

Los diferentes tejidos y partes del cuerpo crecen, se desarrollan y maduran a diferente velocidad (Davis *et al.*, 2008). Durante el desarrollo del animal, desde la etapa inicial hasta la senectud, existen prioridades en el uso de nutrientes por parte de los tejidos corporales (Garcés, 2010). Inicialmente el tejido con mayor prioridad de crecimiento es el tejido nervioso, luego el óseo que va a dar sostén a los demás tejidos, posteriormente el tejido muscular tiene prioridad sobre el graso, pero conforme se acerca la madurez, el tejido graso comienza a tener un crecimiento dominante sobre el muscular (Gómez *et al.*, 2007). Durante su máxima tasa de crecimiento, cada tejido tiene prioridad en el uso de nutrientes (Garcés, 2010). El desarrollo del TGI del cerdo, a diferencia de otras especies, se desarrolla poco durante la vida fetal y se acelera después del nacimiento, ya que se incrementa su longitud, diámetro y peso en los primeros días de vida, maximizándose el crecimiento una vez que se destetan. El TGI alcanza la madurez alrededor de las doce semanas de vida (Reis *et al.*, 2012).



La curva de crecimiento postnatal es sigmoidea y es similar en todas las especies (Figura 7). Durante el período posterior al nacimiento, el animal tiene una fase de crecimiento muy lento, que se continua con una fase de crecimiento muy rápida en la cuál la tasa de incremento en tamaño es casi constante y la inclinación de la curva prácticamente no cambia. Durante los últimos estadios de esta fase, las tasas de crecimiento de músculos, huesos y órganos vitales disminuye y se acelera la acumulación de grasa. Finalmente, a medida que el animal alcanza la madurez el crecimiento disminuye (Garcés, 2010; Yin *et al.*, 2013).

Figura 7. Curva de crecimiento y composición química en cerdos castrados (Casas *et al.*, 2010)



Desde el nacimiento a los 100 kg de PV, aproximadamente el cerdo incrementa entre 65-75 veces su peso corporal, el peso del tejido óseo se incrementa 30 veces, el tejido muscular 81 veces y el tejido adiposo más de 600 veces (Desmoulin, 1986). Las reservas lipídicas al nacimiento son casi inexistentes (1-2%). La deposición de grasa se convierte en la parte principal de

la ganancia diaria de peso a partir de los 50 kg PV. Las proteínas representan 11-12% del peso al nacimiento y 15-16% a los 100 kg PV. La eficiencia en la deposición de tejido magro disminuye a partir de los 60-70 kg PV. El contenido de agua varía en relación inversa a la de los depósitos grasos (Mariscal, 1994; Benito *et al.*, 2000; Juncher *et al.*, 2001).

El crecimiento del lechón hasta los 70 d de edad (con un peso aproximado de 30 kg) está más influenciado por el ambiente y por los genes maternos, que por los propios genes del lechón (Solanes *et al.*, 2004). Se debe considerar que de forma general la distribución de nutrientes en el cerdo está influenciada por el genotipo, el sexo, estatus hormonal, etapa de crecimiento, así como por factores medioambientales como el manejo alimenticio y el clima (Claus y Weiler, 1994; Carrol *et al.*, 1999). En el cerdo durante la etapa de crecimiento (menos de 60 kg PV), la ingesta de energía determina la tasa de deposición de proteína corporal (Schinckel y Lange, 1996). En los cerdos más pesados el genotipo determina la deposición de proteína corporal, aunque también el peso, edad, sexo, ambiente, estado inmunitario y nutrición influyen en esta capacidad (Braun *et al.*, 2007; Schinckel *et al.*, 2003). Los cerdos mayores de 60 kg presentan una menor eficiencia alimenticia y una mayor deposición de tejido graso que los animales de menor peso (Corino *et al.*, 2008; Schinckel y Lange, 1996).

La interacción entre factores genéticos, ambientales y nutricionales provocará una respuesta fisiológica en el cerdo que se traducirá en cómo el animal hará uso de los nutrientes para dirigirlos hacia funciones de mantenimiento (producción o disipación del calor, crecimiento de la piel, producción de anticuerpos, etc.), funciones reproductivas (interacción con otros animales, desarrollo del tracto reproductor, etc.), o para el crecimiento de los tejidos (Ferrando y Boza, 1990; Gómez *et al.*, 2007). El crecimiento de los diferentes tejidos corporales y su composición química, dictarán la eficiencia del crecimiento y la calidad de la carne producida. Generalmente se hace referencia al peso vacío (aquel que no incluye el contenido gastrointestinal) que aproximadamente equivale al 95% del peso, el otro 5% del peso es alimento que está siendo digerido, heces fecales en formación y agua de desecho. Los principales componentes químicos del peso

vacío de un cerdo varían con la edad (Cuadro 2) y para llegar al peso de venta desde su nacimiento, un cerdo tendrá que incrementar su talla 80 veces. El crecimiento del cerdo tiende a ser alométrico (el crecimiento de una parte del cuerpo siempre guarda la proporción con el resto del cuerpo) por lo que la masa ósea siempre guarda proporción con la masa muscular, pero la grasa es la excepción a la regla, ya que éste tejido es en extremo variable y no guarda ninguna proporción con la masa muscular (Gómez *et al.*, 2007).

Cuadro 2. Composición química aproximada del cerdo en diferentes pesos  
(Gómez *et al.*, 2007)

Componente (%)	Peso vivo (kg)			
	1.4	7	28	112
Agua	77	66	69	56
Proteína	18	16	16	16
Grasa	2	15	12	25
Cenizas	3	3	3	3
Aumento de talla	1	5	20	80

La acumulación de grasa en la canal del cerdo ha tratado de reducirse mediante el uso de dietas con perfiles nutricionales mejor balanceados (energía:proteína), lo que ha demostrado ser más eficiente en etapas más tempranas de la engorda del animal (menos de 60 kg PV) (Schinckel y Lange, 1996). En cerdos de mayor peso, esta estrategia no es tan eficiente porque el cerdo tiene un apetito mayor que el que se requiere para satisfacer el nivel de nutrientes para el crecimiento magro, por lo que este incremento en el consumo de energía resulta en la deposición de grasa (Hinson *et al.*, 2011; Fraga *et al.*, 2008). En la actualidad el consumidor solicita carne magra para disminuir problemas de salud como colesterol elevado en sangre, enfermedades coronarias y metabólicas, que han sido asociadas a una ingesta de grasa animal saturada (Sumano *et al.*, 2002). En un cerdo con un peso de 122 kg PV, aproximadamente 100 kg corresponden a la canal y esa canal rendiría

aproximadamente: 6 kg de piel, 12 kg de hueso, 15-36 kg de grasa y 50-62 kg de tejido magro (que contiene entre 4-10% de grasa) (Gómez *et al.* 2007).

#### **2.4.1. Proteínas del músculo esquelético**

El músculo constituye un tejido altamente organizado a nivel morfológico y bioquímico, y su objetivo es transformar la energía química en movimiento mecánico y trabajo (Badui, 2006). Con excepción de los animales que contienen cantidades excesivas de grasa, el músculo esquelético constituye la mayoría del peso de la canal de los animales productores de carne (35 a 65%) (Coria, 2014). Existen más de 600 músculos en el cuerpo animal que varían en forma, tamaño y función. Son órganos que se adhieren directa o indirectamente a los huesos, algunos se adhieren inicialmente a ligamentos, a fascia, a cartílagos o a piel (Xia *et al.*, 2009; Garcés, 2010). La unidad estructural de músculo esquelético es la célula especializada denominada fibra muscular. Las fibras musculares constituyen del 72 al 95% del volumen total del músculo, mientras que los tejidos conectivos, vasos sanguíneos, fibras nerviosas y fluido extracelular completan el resto del volumen, siendo la mayor parte de éstas el fluido extracelular (Garcés, 2010).

Coria (2014) describe que a nivel muscular la composición de proteínas es la siguiente:

- Proteínas miofibrilares (54% miosina y 27% actina principalmente): 50%. Principales responsables de la retención del agua en la carne. El 70% del contenido de agua se ubica en los espacios existentes entre los filamentos gruesos y delgados de la miofibrilla, el 20% en el sarcoplasma y 10% en el tejido conjuntivo y espacios extracelulares (Badui, 2006).
- Proteínas sarcoplásmicas (mioglobina, enzimas, etc.): aproximadamente 30%.
- Proteínas del tejido conectivo (colágeno, elastina, etc.): aproximadamente 20%.

La miosina contiene gran cantidad de aspartato y glutamato, así como aminoácidos básicos, se encuentra altamente cargada y presenta alta afinidad por los iones calcio y magnesio (Coria, 2014). El peso de la miosina es de aproximadamente 500 kDa y está formada por dos cadenas proteicas enrolladas entre sí, que presentan sobre todo hacia uno de sus extremos, varias zonas ricas en  $\alpha$  hélice y en el otro extremo varios grupos -SH que actúan con la actina (Niinivaara y Antila, 1973). La miosina participa en la contracción muscular dependiente de ATP.

La actina es portadora de una molécula de ATP que es empujada por la miosina, transformando la energía química en mecánica. Está conformada por gran cantidad de triptófano y cisteína.

La mioglobina es la principal responsable del color de la carne, está formada por aproximadamente 150 aminoácidos dentro de los cuáles los más abundantes son lisina e isoleucina, y un grupo prostético hemo que tiene un átomo de hierro y un anillo de porfirina. Es una proteína extremadamente compacta y globular en la que la mayoría. Es el almacén de oxígeno en el músculo (Creighton, 1993).

El colágeno es una proteína que incrementa su concentración conforme aumenta la edad del animal. Está formada por 30% de glicina y 35% de prolina e hidroxiprolina. Es la proteína más abundante en los mamíferos y forma parte del epimisio, endomisio y perimisio. Alrededor del 90% del colágeno intramuscular se encuentra en el perimisio. Es el componente mayoritario del tejido conectivo muscular (Bosselmann *et al.*, 1995); y se caracteriza por tener baja capacidad de retención de agua (Salazar, 2006).

#### **2.4.2. Desarrollo muscular esquelético del cerdo**

Existen tres tipos de músculo en el cuerpo: esquelético (estriado y voluntario), cardíaco (estriado e involuntario) y liso (no estriado e involuntario) (Banks, 1996). El músculo esquelético supone el 40% del cuerpo, mientras que el 10% corresponde al cardíaco y liso.

El número de células musculares en un individuo queda fijo desde antes de nacer (Sato, 2016), por lo que la única manera en que crecerá el músculo a partir del nacimiento es por hipertrofia (aumento en el volumen a lo largo y ancho de los músculos) (Gómez *et al.*, 2007). El crecimiento postnatal está determinado por la diferencia entre dos procesos dinámicos: la tasa de síntesis y la tasa de degradación de la proteína (NRC, 2012). Así, durante el desarrollo muscular postnatal, la tasa de síntesis excede la tasa de degradación. Conforme incrementa la edad del cerdo, tanto la tasa de síntesis como de degradación disminuyen, hasta llegar a ser iguales en animales adultos (Andersen *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2013). La tasa de recambio de proteínas también está relacionada con el tipo de fibra muscular, por ejemplo, en las fibras de contracción lenta es mayor que en las fibras de contracción rápida (Andersen *et al.*, 2005).

El mayor incremento en el tamaño del músculo sucede después del nacimiento (Yin *et al.*, 2013). Las fibras musculares crecen por aumento en su diámetro y su longitud (Jiao *et al.*, 2011).

Después de que los animales se han desarrollado, el tamaño del músculo puede aumentar por hipertrofia (Oksbjerg *et al.*, 2004) producida por el trabajo o disminuir (atrofia) debido a la inactividad. A medida que los animales envejecen disminuye el número total de fibras musculares debido a la atrofia y el resto de las fibras se vuelve más grande (Garcés, 2010).

El crecimiento de las masas musculares depende de la energía disponible para crecimiento y hay que considerar que en cerdos jóvenes la eficiencia con la que depositan la proteína es alta y conforme se incrementa el consumo de alimento se incrementa la deposición de tejido graso, por lo que se pierde la eficiencia en el uso de la energía para crecer (Gómez *et al.*, 2007). El tejido muscular maduro está formado por agua (75%), proteínas (20%), grasa (3%), carbohidratos y minerales (2%). Un incremento en la cantidad de proteína depositada, resultará en el aumento de la masa muscular (hipertrofia). La velocidad con la que un cerdo deposita proteína en su cuerpo (en forma de músculo principalmente), es el factor más importante para determinar los requerimientos de aminoácidos en la dieta. Animales jóvenes o relativamente más magros tenderán a tener requerimientos

superiores a los de aquellos más viejos o menos magros; pero esto no funciona en sentido inverso, el dar dietas más concentradas (arriba de los requerimientos del animal), no va a producir animales más magros, sino que reducirá la eficiencia en el uso de los nutrientes, por lo que la alimentación por fases ayuda a incrementar la eficiencia de la producción, ya que los requerimientos del animal cambian al incrementarse su edad. La deposición de tejido magro se va reduciendo conforme avanza la edad y el de grasa se incrementa (Gómez *et al.*, 2007).

El músculo esquelético es el tejido más grande del cuerpo animal. Desde la perspectiva fisiológica, el músculo esquelético es el mayor depósito de proteína (más del 50% de la proteína corporal total) y de aminoácidos libres en el cuerpo, y las vísceras contienen el 15% de la proteína corporal (Rooyackers y Nair, 1997; Gómez *et al.*, 2007).

El uso de dietas altas en proteína es una manera de reducir la energía disponible para depositar tejido graso, pero estas dietas van en contra de la eficiencia de producción (costo elevado de la proteína, reducción en la eficiencia del uso de la proteína y energía, así como afectación al medio ambiente) (Gómez *et al.* 2007, 2009b).

#### **2.4.3. Factores que afectan el desarrollo corporal y muscular esquelético del cerdo**

Aparte de la fase de crecimiento del animal, otros factores que influyen en la síntesis de proteína y grasa son el sexo, el consumo de nutrientes (de manera particular de la presencia de aminoácidos) y la regulación hormonal como la secreción de insulina (Rooyackers y Nair, 1997; Brameld *et al.*, 1999; Garcés, 2010; Drew *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2013).

Los aminoácidos no son sólo sustratos para la síntesis de proteínas, sino que en años recientes se ha estudiado su capacidad de modular señales intracelulares que involucran hormonas que promueven el crecimiento como la

insulina y el factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1, por lo que los aminoácidos también regulan la síntesis de proteínas (Kimball y Jefferson, 2005).

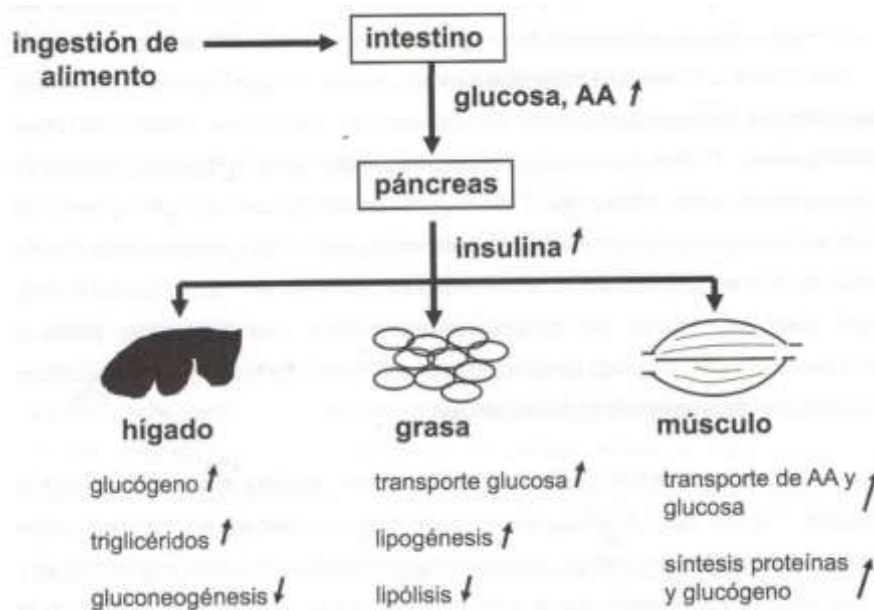
Tras la ingestión de alimentos, se libera la insulina, que es la principal hormona reguladora del contenido de glucosa en sangre. Estudios diversos en cerdos, indican que los niveles séricos de insulina se ven influenciados por la composición química de la alimentación. El consumo de dietas con bajo nivel proteico disminuye los niveles plasmáticos de esta hormona (Martínez *et al.*, 2013).

El aumento posprandial en las concentraciones circulantes de glucosa y/o algunos aminoácidos (Figura 8), así como un aumento en la concentración circulante de glucosa y aminoácidos (principalmente arginina y leucina) o ciertos ácidos grasos (ácido oleico y palmítico) estimulan la secreción de insulina (Mejía *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2010, 2011; Kong *et al.*, 2012). La arginina y leucina son de particular importancia en el incremento del inicio de la traducción y síntesis de proteínas (Yao *et al.*, 2008). Parte de los efectos de la insulina como mediador importante de la síntesis proteica en el músculo, es que modifica el suministro de nutrientes a los músculos a través de un efecto vasodilatador directo, que aumenta el flujo sanguíneo, y de la reducción de las concentraciones arteriales de glucosa y aminoácidos. La insulina incrementa el transporte de aminoácidos y proteosíntesis, disminuye la proteólisis muscular, por lo que es el factor más importante en la regulación del balance proteico, particularmente del anabolismo del músculo esquelético. El crecimiento rápido y la condición magra se asocia con el aumento de la sensibilidad de los músculos hacia la insulina y el incremento del metabolismo energético de tipo glucolítico en el músculo. La disminución a la sensibilidad de la insulina en el músculo esquelético induce un incremento en los niveles plasmáticos de insulina, lo que provoca falta de crecimiento y mayor cantidad de grasa en la canal. La resistencia a la insulina se relaciona con la edad (a mayor edad menor tolerancia a la glucosa), con el manejo alimenticio (los niveles plasmáticos de glucosa e insulina aumentan con la frecuencia alimenticia) y puede inducirse con factores nutricionales como el exceso de grasa o carbohidratos en la dieta (Garcés, 2010).



Existen otras hormonas y neurotransmisores que también influyen la secreción de insulina (Sutter, 1982). Hormonas como el glucagón y la somatostatina, así como neuropéptidos gastrointestinales que son liberados durante la digestión del alimento, exposición crónica a concentraciones elevadas de hormonas como la hormona de crecimiento, el cortisol y los estrógenos, aumentan también la secreción de insulina. Además de jugar un rol importante en la regulación de la glicemia, la insulina ejerce acciones anabólicas, ya que estimula el transporte de glucosa y aminoácidos a nivel celular y la lipogénesis. La insulina también ejerce acciones anticatabólicas (inhibe la lipólisis, la gluconeogénesis, la cetogénesis, etc. en sus diferentes tejidos blanco (Mejía *et al.*, 2007). La insulina estimula el transporte intracelular de aminoácidos a nivel hepático y muscular, favorece el uso de aminoácidos para la síntesis proteica en el tejido muscular (Sato, 2016), y ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre su propia secreción (Mejía *et al.*, 2007).

Figura 8. Secreción de insulina en respuesta al consumo de alimento y algunos de los efectos metabólicos de esta hormona a nivel tisular (Mejía *et al.*, 2007).



Otra hormona que influye en el metabolismo del músculo esquelético es la hormona de crecimiento, la cual aumenta la intensidad de algunos procesos metabólicos que emplean energía, principalmente la síntesis de proteína (Hayashi y Proud, 2007).

## **2.5. La alimentación y su relación con la expresión de genes**

Promover el crecimiento, el desarrollo muscular y la eficiencia alimenticia son los principales objetivos de la producción porcina. La optimización de la dieta para incrementar el crecimiento, mantener la salud y minimizar las consecuencias de enfermedades es muy importante (Suryawan *et al.*, 2011).

Los cerdos requieren energía, aminoácidos esenciales (lisina, arginina, histidina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, treonina, triptófano, metionina) y proteína (que cubra las necesidades de los aminoácidos no esenciales), ácidos grasos esenciales (linoleico y linolénico), vitaminas y minerales (NRC, 1998).

La nutrición, que está relacionada con la disponibilidad de nutrientes a nivel celular, tiene relación directa con la expresión de los genes, ya que dichos nutrientes están involucrados en la regulación del desarrollo de los animales (Brameld *et al.*, 1995, 1999; Bauer *et al.*, 2011; Sato, 2016). La nutrigenómica es la rama de la ciencia que estudia esta relación, con el objeto de identificar y entender las interacciones a nivel molecular entre los nutrientes y otras moléculas dietarias bioactivas con el genoma y las consecuencias funcionales en la expresión de los genes (Liu y Qian, 2011); lo cual proporciona una base para la comprensión de la actividad biológica de los componentes dietéticos. La traducción del RNAm representa el último paso del flujo genético y define el proteoma. La regulación de la traducción es fundamental para la expresión génica, en particular bajo un exceso o deficiencia de nutrientes (Liu y Qian, 2011).

El desarrollo de la nutrición proteínica de los cerdos se inició cuando se formulaba la dieta en base a proteína total, después debido a la aparición de los aminoácidos cristalinos se analizaron los requerimientos de aminoácidos esenciales y se formularon dietas bajas en proteína suplementadas con lisina

(primer aminoácido limitante) (Baker *et al.*, 1975). Posteriormente, surgió el concepto de proteína ideal, que se basa en una relación de los aminoácidos esenciales con respecto a la lisina y de ésta respecto a la proteína dietaria, lo que permite disminuir el nivel de la proteína sin afectar el comportamiento productivo y sólo se debe considerar el sexo y calidad genética del animal (Gómez *et al.*, 2007).

El rol de los aminoácidos como precursores de la síntesis de proteínas musculares ha sido reconocido durante décadas (Kobayashi *et al.*, 2003; Kimball y Jefferson, 2005; Liu *et al.*, 2014). Las modificaciones nutricionales afectan la deposición de proteína en el tejido muscular (Liu *et al.*, 2014). Cerdos alimentados con dietas elevadas en el contenido de proteína (18%) incrementan la deposición de tejido muscular esquelético (Ruusunen *et al.*, 2007).

La estimulación inducida por la alimentación sobre la síntesis de proteína muscular es modulada por una mayor sensibilidad, que se da de modo postprandial a la insulina y aminoácidos (Kimball *et al.*, 2000; Avruch *et al.*, 2006; Jeyapalan *et al.*, 2007; Suryawan *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2008).

Las camadas de cerdas sometidas a una restricción proteica durante la lactación (300-400 comparado con 700-900 g de proteínas/d), exhiben una velocidad de crecimiento reducida en diversos experimentos (Kusina *et al.*, 1999) sobretodo a partir de la tercera semana de lactación (Jones y Stahly, 1999).

Estudios en cerdos neonatos y ratas indican que la síntesis de proteína muscular es reprimida después de 10-18 horas de ayuno y estimulada al máximo de 1 a 3-4 horas después de la alimentación (Kimball *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2007; Regmi *et al.*, 2010). Dichas respuestas disminuyen con el crecimiento (Yin *et al.*, 2013), ya que por ejemplo en respuesta a la alimentación, la tasa de síntesis de proteína muscular esquelética en cerdos de 7 días de edad se incrementa de 15 a 24%/d y en un cerdo de 26 días de edad se incrementa de 4 a 6%/día. Lo anterior sugiere que la capacidad del músculo para responder a la alimentación o presencia de nutrientes, se ve afectada en un punto temprano del desarrollo (Kimball *et al.*, 2001). Existe una elevada capacidad para la síntesis de proteínas en los cerdos jóvenes derivado del alto contenido ribosomal junto

con una elevada eficiencia del proceso de traducción, permitiendo un acelerado rango de síntesis de proteínas, y por ende, un incremento en la deposición de proteína muscular (Davis *et al.*, 2008).

Dentro de los genes que han sido evaluados en cerdos, relacionados con la alimentación, se encuentran aquellos que codifican proteínas que participan en el inicio de la síntesis de proteína a nivel del músculo esquelético, como lo son los genes eIF2B1 y eIF4e, que cuando se compara el nivel de proteína dietaria consumida por los cerdos pueden verse influenciados en su expresión (Escobar *et al.*, 2006; Suryawan *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014), por lo que el efecto detrimental de los taninos en el proceso digestivo, al unirse a los nutrientes y a las enzimas digestivas, puede llegar a afectar la disponibilidad de aminoácidos a nivel celular en los tejidos corporales del cerdo y, probablemente, también se afecte la expresión de estos mismos genes.

Liu *et al.* (2014) describen que hay reportes que indican que el incremento de la síntesis de proteína muscular esquelética está influenciado por la expresión de los factores de inicio de la traducción eucarióticos incluyendo eIF2B y eIF4e. Ellos describen que el consumo de elevados niveles dietarios de proteína incrementaron la expresión del eIF2B1, independientemente del peso corporal de los cerdos y que la expresión del gen eIF4e también fue mayor en cerdos de 30 kg de PV consumiendo dietas elevadas en proteína, sin haber existido una modificación en el consumo diario de alimento entre los cerdos que consumieron dietas altas o bajas en su contenido de proteína. Otra diferencia que encontraron es que el peso del músculo de la canal y el contenido de proteína del músculo longuísimo, cuando los cerdos pesaron 60 y 100 kg, fue mayor en los que consumieron las dietas elevadas en su contenido de proteína, lo que sugiere una mayor deposición de proteína muscular consumiendo dietas con alto contenido de proteína.

## **2.6. Presencia de aminoácidos a nivel celular y síntesis de proteína muscular**

La homeostasis de proteínas es resultado de una compleja interacción de vías anabólicas y catabólicas. El músculo esquelético sirve como un reservorio de aminoácidos durante períodos de ayuno o cuando hay un aporte insuficiente que no permite cubrir las demandas metabólicas (Wheatley *et al.*, 2013). Los aminoácidos funcionan como señaladores nutricionales y tienen un papel central en la regulación de muchos procesos celulares incluyendo la síntesis de proteínas tanto miofibrilares como sarcoplásmicas, estimulando numerosas rutas celulares de señalización importantes en el proceso de traducción. En específico, estimulan la síntesis de proteína muscular esquelética incrementando la velocidad de la iniciación de la traducción y dicho proceso depende en gran medida de la presencia de los aminoácidos esenciales leucina o arginina (Lang *et al.*, 2003; Escobar *et al.*, 2005; Lang, 2006; Drummond *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011).

La información genética contenida en la secuencia de nucleótidos del DNA se transcribe en el núcleo en una secuencia de específicos nucleótidos en la molécula de RNA mensajero (RNAm). La secuencia de nucleótidos en el transcrito de RNA es complementaria a la secuencia de nucleótidos de la cadena molde de su gen, de acuerdo con las reglas de los pares de bases. Numerosas clases diferentes de RNA se combinan para dirigir la síntesis de proteínas. En los organismos procariotas existe una correspondencia lineal entre el gen, el RNAm transcrito del gen, y el polipéptido resultante, pero en los eucariotas superiores el transcrito primario es mayor que el RNAm maduro (Granner, 2004).

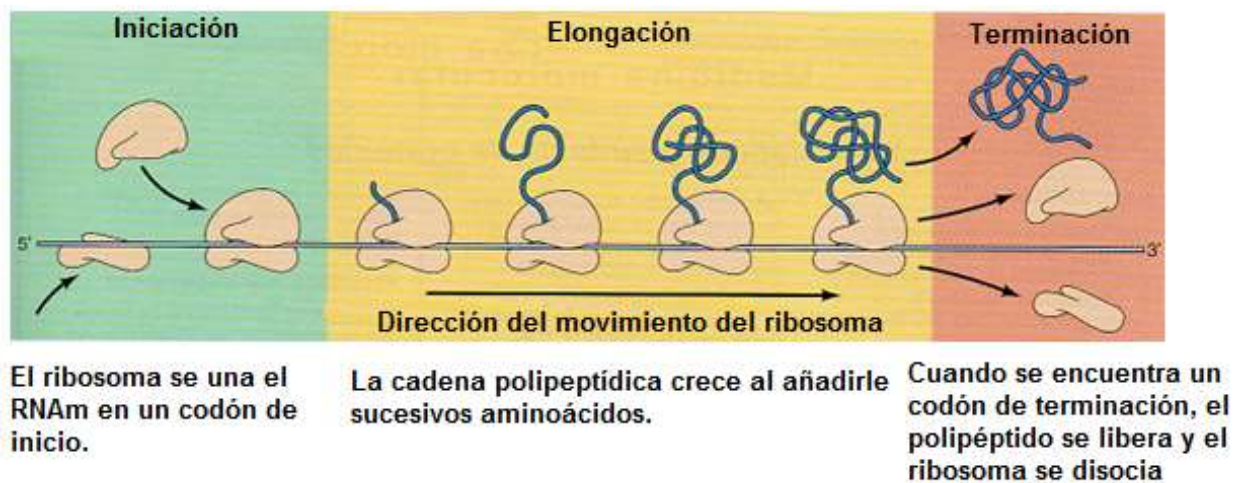
Existen tres fases en la síntesis de proteínas: iniciación, elongación y terminación. Cada paso involucra diversos factores proteicos que son extrínsecos al ribosoma y generalmente su regulación está dada por alteraciones en su fosforilación (Wang y Proud, 2006; Hayashi y Proud, 2007; Liu y Qian, 2011; Granner, 2004).

## **2.7. Inicio de la síntesis de proteínas en el músculo esquelético**

La traducción del RNAm comienza cerca de su terminal 5', con la formación del correspondiente extremo amino terminal de la molécula de proteína. El mensaje se lee de 5' a 3', y concluye con la formación del extremo carboxilo terminal de la proteína (Granner, 2004).

La traducción del RNAm se divide en 3 grandes fases: iniciación, elongación y terminación (Figura 9). En la fase de iniciación intervienen diversas moléculas, dentro de las cuáles las más importantes son el complejo ternario eIF2-GTP-Met-RNAt<sub>i</sub> y el complejo eIF4 regulado por la vía mTOR (Liu y Qian, 2011) y dentro de estos complejos se encuentran los factores eIF2B y eIF4e (Cuadro 3).

Figura 9. Esquema general de la traducción (Cooper y Hausman, 2007)



Cuadro 3. Factores de la traducción de proteínas (Cooper y Hausman, 2007)

Función	Factor
Iniciación	eIF1, eIF1A, eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4e, eIF4G, eIF5
Elongación	eEF1 $\alpha$ , eEF1 $\beta\gamma$ , eEF2
Terminación	eRF1, eRF3

La iniciación de la síntesis de proteína requiere que haya una molécula de RNAm para su traducción en los ribosomas. Una vez unido el RNAm al ribosoma, éste encuentra el marco de lectura correcto sobre el RNAm y se inicia la traducción. Este proceso involucra: RNA de transferencia (RNAt), RNA ribosomal (RNAr), RNAm y por lo menos 10 factores de iniciación de eucariotas (eIF), algunos de los cuales tienen múltiples subunidades (de 3 a 8) (Granner, 2004; Jackson, 2005, Kobayashi *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2014). También están involucrados GTP, ATP y aminoácidos.

El inicio de la traducción funcionalmente puede ser dividido en 3 fases (Figura 10):

- Unión del iniciador metionil-RNAt (met-RNAti) que es llevado a la subunidad ribosomal 40S por el eIF2 (formando un complejo con GTP), para formar el complejo de preiniciación 43S (Kimball y Jefferson, 2005; Cooper y Hausman, 2007). eIF2B1 cataliza el intercambio de eIF2B unido a GDP por GTP para que se de la transferencia del met-RNAti (Spurlock *et al.*, 2006).
- La unión del RNAm al complejo de preiniciación 43S para formar el complejo de preiniciación 48S, proceso que requiere de la hidrólisis de ATP (Granner, 2004; Cooper y Hausman, 2007). Lo anterior se da gracias a que el ARNm es reconocido y dirigido hacia el ribosoma por los factores eIF4 (Kimball y Jefferson, 2005; Cooper y Hausman, 2007). El *cap* o casquete de metil-guanosil trifosfato del extremo 5' del RNAm es reconocido por el eIF4e (Granner, 2004). El eIF4e forma parte de un complejo de proteína que fija al casquete denominado eIF4F, junto con otros factores que forman parte de este complejo como lo son el complejo eIF4G-eIF4A. El eIF3 es una proteína clave debido a que se une con alta afinidad con el eIF4F que permite la unión con el complejo de preiniciación 43S. El eIF4G, se une al factor eIF4e y a una proteína asociada a la cola de poli-A en el extremo 3' del ARNm (proteína de unión a poli-A o PABP) (Granner, 2004; Cooper y Hausman, 2007). Por lo tanto, los factores de iniciación eucariotas reconocen tanto el extremo 5' como 3' del ARNm, siendo responsables del

Figura 10. Iniciación de la traducción en células eucariotas (modificado de Cooper y Hausman, 2007)





- La unión de la subunidad ribosomal 60S al complejo de preiniciación 48S para formar el complejo de iniciación activo 80S (Kimball *et al.*, 2002). El complejo de preiniciación 48S evalúa el ARNm hasta identificar un codón de iniciación adecuado que generalmente es 5'-AUG. Cuando el codón AUG es reconocido, eIF5 provoca la hidrólisis del GTP unido a eIF2. Los factores de iniciación (incluyendo eIF2 unido a GDP) son liberados, y la subunidad 60S se une al complejo de preiniciación 48S para formar el complejo de iniciación 80S de las células eucariotas (Kimball y Jefferson, 2005; Cooper y Hausman, 2007).

Tras la formación del complejo de iniciación, la traducción continúa con la elongación de la cadena polipeptídica (Cooper y Hausman, 2007).

Los aminoácidos esenciales regulan la señalización de al menos dos vías involucradas en la traducción de RNAm: unión del iniciador metionil-RNAt a la subunidad ribosomal 40S para formar el complejo de preiniciación 43S y la unión del RNAm al complejo de preiniciación 43S (Kimball y Jefferson, 2005).

#### **2.7.1. La vía mTOR en el inicio de la síntesis de proteínas y su relación con eIF4e**

La rapamicina fue inicialmente empleada como un potente antifúngico y posteriormente como un inmunosupresor en trasplantes de órganos y en la terapia contra el cáncer. Estudiando esta molécula se descubrió que actúa sobre mTOR. Esta proteína mTOR tiene funciones pleiotrópicas (multisistémicas) y participa en la regulación del inicio de la transcripción del ARNm y la traducción a proteínas en respuesta a concentraciones intracelulares de aminoácidos y otros nutrientes esenciales. mTOR tiene el control transcripcional de genes metabólicos y genes relacionados con la síntesis de proteína en el músculo esquelético (O'Connor *et al.*, 2003 a, b ; Machín *et al.*, 2006; Wullschger *et al.*, 2006; Chaveroux *et al.*, 2013; Coffey *et al.*, 2016).

mTOR puede detectar nutrientes como el carbono y nitrógeno, indicándole a las células que pueden crecer y proliferar (Machín *et al.*, 2006). mTOR integra señales de crecimiento y de disponibilidad de aminoácidos (Coffey *et al.*, 2016).

Dicha vía de señalización es reguladora importante del crecimiento y del metabolismo celular, que reacciona ante la presencia de factores de crecimiento como la insulina y del estado energético, regulando el tamaño, crecimiento y sobrevivencia celular (Machín *et al.*, 2006; Rodríguez, 2011; Laplante y Sabatini, 2012; Berkers *et al.*, 2013). Por tal motivo, mTOR es una proteína necesaria para el crecimiento, desarrollo y fisiología normal de los individuos (Chaveroux *et al.*, 2013). Interviene en la organización del citoesqueleto de actina, en el tráfico de membrana, degradación de proteínas, señalización de la proteína primer mensajero quinasa C (PKC) y biogénesis del ribosoma. Se ha publicado que la activación de la síntesis de proteínas puede ser inhibida por la rapamicina, implicando que la vía de señalización mTOR está inmiscuida en este proceso (Wang y Proud, 2006; Hayashi y Proud, 2007) (Figura 11).

mTOR es una proteína serina/treonina quinasa relacionada a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PIK3) (Heitman *et al.*, 1991; Chaveroux *et al.*, 2013) de 289 kDa que regula eventos mediante la formación de distintos complejos multiproteicos, siendo mTOR el componente central de dichos complejos y siendo los principales complejo 1 mTOR (mTORC1) y complejo 2 mTOR, los cuáles fosforilan diferentes blancos (Coffey *et al.*, 2016). El complejo 1 (mTORC1) es sensible a rapamicina y su complejo 2 (mTORC2) es insensible a rapamicina. La rapamicina inhibe el mTORC1, pero el tratamiento prolongado con rapamicina también afecta el mTORC2 (Fang *et al.*, 2013).

mTORC1 es un integrador central de una amplia gama de señales fisiológicas que estimulan la actividad o metabolismo celular, así como el crecimiento y proliferación celular (Machín *et al.*, 2006; Rodríguez, 2011; Coffey *et al.*, 2016). Las señales fisiológicas que integra mTORC1 son los niveles de aminoácidos (particularmente leucina), insulina, factores de crecimiento, el estado energético, niveles de oxígeno, etc. (Kim *et al.*, 2002; Gulati y Thomas, 2007). mTORC1 activa la biosíntesis de proteínas e inhibe la autofagia (Coffey *et al.*, 2016).

Figura 11. Funciones y factores que afectan la actividad general de mTOR



mTORC1 fosforila los efectores de mTOR como el factor eucariótico de iniciación 4E (eIF4e) unido a la proteína 1 (que forman en conjunto el complejo 4E-BP1) y también fosforila a la S6 ribosomal quinasa 1 (S6K1) (Yamaoka *et al.*, 2005; Drummond *et al.*, 2008) activando de esta manera la traducción sobretudo del RNAm con casquete (Coffey *et al.*, 2016). La fosforilación de la proteína represora 4E-BP1, permite la disociación de eIF4e, permitiéndole unirse a eIF4G. Este complejo activo eIF4e-eIF4G favorece la unión del RNAm al complejo ribosomal 40S en el inicio de la traducción del RNAm (Kimball *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2003; Suryawan *et al.*, 2004) y esta unión es potencializada por la alimentación, presencia de aminoácidos, sobretudo leucina o la insulina misma (Jeyapalan *et al.*, 2007). La fosforilación de 4EBP1 se da inicialmente en la Thr-37/Thr46, la cual es suficiente para bloquear su asociación con eIF4e, posteriormente las fosforilaciones se dan en la Thr-70 seguido de la Ser-65. mTORC1 es la proteína cinasa responsable de la mayoría de la fosforilación de 4EBP1 (Coffey *et al.*, 2016). Jiao *et al.* (2011) describen que la expresión de

eIF4e puede contribuir en el incremento de la síntesis de proteína muscular e inhibe la degradación de la misma.

El complejo eIF4F es particularmente importante en el control de la velocidad de traducción de las proteínas. El complejo eIF4F es un complejo heterodimérico formado por eIF4A, eIF4e y eIF4G. eIF4F es un complejo formado por eIF4e que se une al casquete en la terminal 5' del RNAm (Merrick, 2015), y por eIF4G que sirve como una proteína de soporte, también se une al eIF3 que se une al complejo con la subunidad ribosomal 40S, así como a la eIF4A y eIF4B, y al complejo de ATP-asa-helicasa que ayuda a desdoblar el RNA (Granner, 2004; Merrick, 2015). La eIF4e es responsable del reconocimiento de la estructura del casquete del RNAm, que es el paso limitante de la velocidad de la traducción (Granner, 2004; Jackson, 2005).

El factor eIF4e es el único con una afinidad específica para unirse con la estructura RNAm 5'-cap (Korneeva *et al.*, 2001) presente en la mayoría de los RNAm transcritos, formando así el complejo eIF4e-RNAm (Lang *et al.*, 2003). Los RNAm que no contienen el casquete se traducen con menor eficiencia que aquellos que sí lo contienen (Merrick, 2015). El factor eIF4e está formado por un solo péptido (Jackson, 2005). Liu *et al.* (2014) mencionan que al incrementarse la síntesis de proteína muscular esquelética, se incrementa la expresión de los genes eIF4e, aunque otros autores indican que aún no hay suficientes resultados que realmente puedan relacionar la cantidad de aminoácidos disponibles para la síntesis de proteína muscular con la mayor expresión de este gen eIF4e (Suryawan y Davis, 2014).

El acoplamiento del RNAm al aparato ribosomal es un paso clave en la regulación del inicio de la traducción de proteínas y dicho acoplamiento en la mayoría de los RNAm eucarióticos depende de la actividad de eIF4e que se une a la estructura de los RNAm llamada 5'-m<sup>7</sup>GTP-casquete y al factor de iniciación eIF4G. A través de la interacción de el complejo eIF4e-eIF4G con el ribosoma unido por el factor eIF3, la subunidad ribosomal 40S es posicionada en el 5'-terminal del RNAm. Posteriormente, la subunidad 40S escanea el RNAm (5'-3') para detectar el codón de inicio de la traducción antes de que la subunidad 60S

se una y forme el primer enlace peptídico (von der Haar *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2005).

El factor eIF4e se encuentra presente en concentraciones relativamente bajas y su concentración es limitante en el inicio de la síntesis de proteína así como en la velocidad en la unión del RNAm a los ribosomas (Sonenberg, 1996; Lang *et al.*, 2003; Lang, 2006), pero un incremento abundante y descontrolado del gen eIF4e está relacionado con la presencia de cáncer (Sorrells *et al.*, 1997).

La unión de la subunidad ribosomal 60S al complejo de iniciación 48S involucra la hidrólisis del GTP unido al eIF2 por el eIF5. Esta reacción produce la liberación de los factores de iniciación unidos al complejo de iniciación 48S (dichos factores se reciclan posteriormente) y la rápida asociación de las subunidades 40S y 60S para formar el ribosoma 80S. En este punto, el met-RNAt<sup>i</sup> está sobre el sitio P del ribosoma para comenzar la elongación (Granner, 2004).

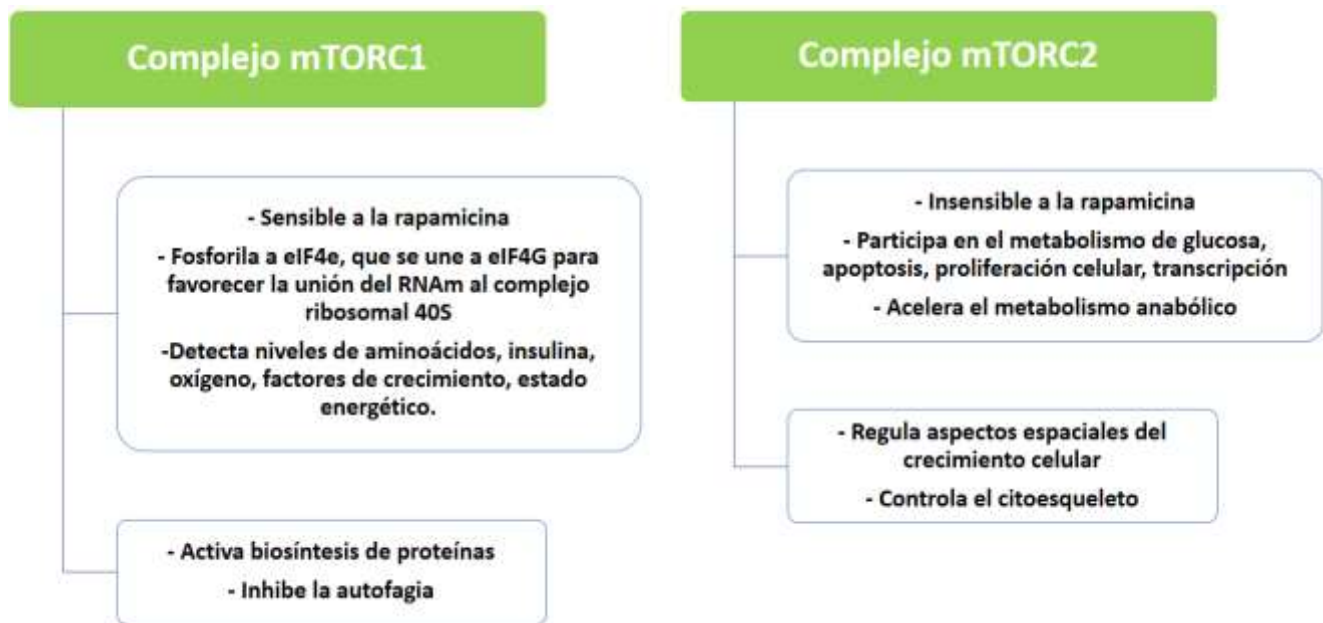
La elongación es un proceso cíclico en el ribosoma en el que se agregan un aminoácido a la vez en la cadena peptídica naciente. La secuencia peptídica depende del orden de los codones en el RNAm. La elongación incluye varios pasos catalizados por proteínas llamadas factores de elongación que son: la unión del aminoacil-RNAt al sitio A, formación del enlace peptídico y translocación.

mTORC1 tiene presente a la proteína Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*), e interactúa con el complejo insensible a rapamicina (mTOR2 o mTORC2), que se define por su interacción y presencia de Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) (Rodríguez, 2011; Coffey *et al.*, 2016). Raptor se requiere para la mayoría de las señalizaciones que controlan la síntesis de proteína, ya que modula la traducción del RNAm y la biogénesis del ribosoma, así como el metabolismo de los nutrientes y autofagia (Machín *et al.*, 2006; Rodríguez, 2011). La insulina y diversos factores de crecimiento estimulan mTORC2 que controla la sobrevivencia celular y la proliferación de las células (Coffey *et al.*, 2016).

Rictor, que es parte de mTORC2, está involucrado en las dinámicas del citoesqueleto. Al igual que mTORC1, mTORC2 fosforila. El complejo rictor-mTOR

activa (fosforila) la proteína serina/treonina quinasa B (PKB)/Akt en el residuo serina S473 que juega un papel importante en múltiples procesos celulares como el metabolismo de glucosa, apoptosis, proliferación celular, transcripción y migración celular (Blättler *et al.*, 2012). El complejo rictor-mTOR regula Akt/PKB, PKCa, Rho/rac, para controlar la supervivencia celular, proliferación, metabolismo y citoesqueleto. mTORC2 regula aspectos espaciales del crecimiento celular y controla el citoesqueleto (Cybulski y Hall, 2009), acelerando así el metabolismo anabólico y permitiendo la supervivencia celular (Sarbasov *et al.*, 2004) (Figura 12).

Figura 12. Actividades de los complejos mTOR



En resumen mTOR controla al menos 3 tipos de componentes de la maquinaria de traducción (Wang y Proud, 2006):

- a) Las proteínas cinasas ribosomales (S6Ks) que son activadas por insulina y otras sustancias y fosforila a S6, que es un componente del complejo de la subunidad ribosomal 40S (Avruch *et al.*, 2001).
- b) La proteína 1 de unión al eIF4e (4E-BP1) que se une e inhibe a la proteína eIF4e que se une al casquete del RNAm y por lo tanto bloquea la formación

de los complejos de los factores de iniciación activos que contienen la proteína eIF4G. La activación de las señales mTOR permite la fosforilación de 4E-BP1 para su liberación de eIF4e que se vuelve libre para asociarse a eIF4G.

- c) mTOR controla la actividad del factor cinasa de elongación 2 (eEF2), fosforilándolo o desfosforilándolo (Browne y Proud, 2002).

Por lo anterior, mTOR controla la iniciación y elongación de la traducción (Hayashi y Proud, 2007).

La fosforilación de mTOR alcanza su punto máximo a los 30 minutos posteriores después de iniciar la alimentación, seguida de la fosforilación de mTORC1, 4E-BP1, eIF4G y S6 y finalmente por la regulación de la unión del RNAm con el complejo de preiniciación 43S, se debe considerar que el inicio de la síntesis de proteínas es el paso limitante de la traducción (Wilson *et al.*, 2009).

### **2.7.2. eIF2B1 en el inicio de la síntesis de proteínas**

La vía mTOR (molécula blanco de la rapamicina) y del factor de iniciación eucariótico 2B (eIF2B), juegan un papel importante en la modulación del proceso de iniciación de la traducción de síntesis de proteínas en el músculo esquelético (Mayhew *et al.*, 2011). El complejo mTOR media los efectos dependientes de insulina en la iniciación de la traducción y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina eIF2B cataliza el intercambio de eIF2 unido a GDP por GTP, lo que facilita la transferencia del RNAt de metionina a la subunidad 40S ribosomal por el eIF2 (Spurlock *et al.*, 2006). La actividad de eIF2B se relaciona con la síntesis de proteína bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, y así como mTOR, la actividad glucolítica de eIF2B en el músculo esquelético parece ser modulada por las concentraciones circulantes de insulina (Crozier *et al.*, 2003; Kimball *et al.*, 2003) que también es dependiente de la presencia de aminoácidos circulantes.

mTOR también dirige diversos RNAm hacia la traducción de proteínas que sirven en el proceso de transcripción como el factor de iniciación eucariótico eIF2B (Fluckey *et al.*, 2006). La leucina no ha mostrado alteraciones

significativas en la actividad del factor de iniciación eucariótico eIF2B aunque sí afecta la síntesis de proteína muscular (Eley *et al.*, 2007; Orellana *et al.*, 2007).

El factor eIF2B es en específico un cambiador de guanina-nucleótido para el eIF2. En eucariotas, la traducción se inicia por una serie de factores de iniciación de la traducción eucarióticos (eIFs). En el primer paso, el iniciador aminoacilado metionil-RNAt ( $\text{Met-RNAt}^{\text{Met}}$ ) es conducido a la subunidad ribosomal 40S por el factor de iniciación eucariótico 2 (eIF2), una proteína heterodimérica (subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). La subunidad  $\gamma$  del eIF2B se une al GTP o GDP, y la unión GTP-eIF2 permite formar un complejo ternario con el  $\text{Met-RNAt}^{\text{Met}}$ . El complejo ternario eIF2-GTP-  $\text{Met-RNAt}^{\text{Met}}$  se une a la subunidad ribosomal 40S junto con otros eIFs, incluyendo eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5. El complejo de preiniciación 43S resultante posteriormente se asocia con el RNAm y con el eIF4F (complejo de unión al casquete), para formar así el complejo 48S de preiniciación, el cuál escanea el RNAm hasta que el anticodón de  $\text{Met-RNAt}^{\text{Met}}$  reconoce un codón de inicio AUG (Kakuta *et al.*, 2004; Pestova *et al.*, 2007). Existen 2 RNAt para metionina, uno especifica la metionina para el codón iniciador, el otro para las metioninas internas y cada uno tiene una secuencia de nucleótidos única. Este complejo ternario se une con la subunidad ribosomal 40S para formar el complejo de preiniciación 43S, el cual se estabiliza por la asociación de el eIF3 y el eIF1A (Granner, 2004). Durante este proceso, el eIF2 unido al GTP es hidrolizado con la ayuda del eIF5 (la proteína GTPasa de la activación específica para eIF2). El eIF2 unido a GDP se libera cuando la subunidad ribosomal se une al complejo. El cambio de GDP por GTP permite que el eIF2 restablezca su capacidad de unión a  $\text{Met-RNAt}^{\text{Met}}$ . Esta reacción de intercambio es catalizada por el factor de inicio de la traducción eucariótica 2B (eIF2B), que es un factor de intercambio de guanina-nucleótido (GEF) específico para eIF2 (Hinnebusch *et al.*, 2007). El eIF2B es el paso clave de la regulación de la traducción eucariótica (Kakuta *et al.*, 2004; Hiyama *et al.*, 2009).

Bajo condiciones de estrés, la Ser51 de la subunidad  $\alpha$  del eIF2 (eIF2 $\alpha$ ) es fosforilada por diversas eIF2 $\alpha$  cinasas, incluyendo la doble cadena RNA-cinasa activada (PKR), la cinasa del retículo endoplásmico tipo PKR, la proteínacinasas



de control general no controlable (GCN)2 y el inhibidor hemorregulado. El eIF2 fosforilado [eIF2( $\alpha$ P)] muestra una alta afinidad por el eIF2B e inhibe la actividad de eIF2B GEF competitivamente contra el eIF2 no fosforilado (Rowlands *et al.*, 1988). La inhibición de la actividad del eIF2B GEF conduce a la pérdida del complejo ternario eIF2-GTP- Met-RNAt<sup>Met</sup> y por lo tanto bloquea completamente el inicio de la traducción (Hiyama *et al.*, 2009).

El factor de inicio de la traducción en mamíferos eIF2B está conformado por 5 polipéptidos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  en orden creciente de tamaño) y su principal función es intercambiar nucleótidos de guanosina que cataliza la conversión de eIF2/GDP en eIF2/GTP (Hinnebusch, 2005; Jackson, 2005; Pavitt, 2005; Wortham *et al.*, 2014; Wortham y Proud, 2015). La actividad de eIF2B disminuye cuando hay una baja en la concentración de aminoácidos y regresa cuando estos son repuestos (Kobayashi *et al.*, 2003).

El gen eIF2B1 provee instrucciones para elaborar una de las cinco partes de la proteína llamada eIF2B, específicamente la subunidad alfa de esta proteína, el gen eIF2B2 para la subunidad eIF2B $\beta$ , el gen eIF2B4 para la subunidad eIF2B $\delta$ , el gen eIF2B3 para la subunidad eIF2B $\gamma$ , el gen eIF2B5 para la subunidad eIF2B $\varepsilon$  (Pavitt, 2005).

El GTP unido a eIF2 es responsable de cargar el iniciador metionil-RNAt dentro del ribosoma para permitir la iniciación de la síntesis de proteínas, por lo que eIF2B es un factor clave que controla el rango de síntesis de proteínas en las células (Wortham y Proud, 2015).

Un mecanismo clave de la actividad regulatoria de eIF2B es mediado por la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  de su sustrato, eIF2, en la Ser51 en respuesta al estrés celular incluyendo infecciones virales, privación de aminoácidos y acumulación de proteínas no plegadas en el retículo endoplásmico (Wek *et al.*, 2006). El eIF2B fosforilado se une más fuerte e inhibe eIF2B evitando de ese modo el reciclaje del eIF2 no fosforilado-GDP (Fabian *et al.*, 1997).

Las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  del eIF2B forman un subcomplejo regulatorio, mientras que la  $\gamma$  y  $\varepsilon$  forman subcomplejos catalíticos (Kakuta *et al.*, 2004).

Kobayashi *et al.* (2003) describen que la actividad de eIF2B para la síntesis de proteínas se ve afectada cuando la disponibilidad de aminoácidos sanguíneos disminuye.

En resumen, el eIF2 tiene una función relativamente sencilla, ya que forma el complejo eIF2-GTP-Met-tRNA que sirve para unir al RNAt iniciador en la subunidad ribosomal 40S (Hershey y Merrick, 2000). Así, el factor eIF2B modula el primer paso en el inicio de la traducción (Kimball *et al.*, 2003).

eIF2B también funciona como un centro regulador que rige la tasa de síntesis global de proteínas en respuesta al estrés celular que incluye inanición, infecciones virales, choque térmico, acumulación de proteínas plegadas en el retículo endoplásmico, cambios en los niveles de calcio intracelular y estrés oxidativo (Marom *et al.*, 2011). El eIF2B disminuye su actividad cuando la concentración sanguínea de aminoácidos disminuye y regresa a la normalidad cuando son repuestos (Kobayashi *et al.*, 2003).

## **2.8. Impacto de taninos y kafirinas en la expresión de los genes eIF2B1 y eIF4e**

Dado que los nutrientes disponibles para la síntesis de proteína muscular pudieran verse afectados por los taninos y kafirinas, era probable que la expresión de genes como el eIF2B1 y el eIF4e en el músculo esquelético de los cerdos, fuera afectada. En los artículos consultados no se menciona que los taninos y kafirinas afecten la expresión de estos genes, sin embargo, se puede inferir que esa disminución en la presencia de nutrientes ocasionada por la presencia de taninos y kafirinas afectaría la expresión de los genes mencionados.

Liu *et al.* (2014) investigaron los mecanismos bajo los cuáles se incrementa la acumulación de proteína muscular en cerdos cuando son alimentados con dietas con diferentes niveles de proteína, encontrando que con dietas altas en proteína (18%), los cerdos incrementaron el nivel de expresión del gen eIF2B1 durante todo el período de crecimiento y del gen eIF4e cuando los cerdos tenían un peso de 30 kg. eIF2B disminuye su actividad cuando la concentración sanguínea de

aminoácidos disminuye y regresa a la normalidad cuando son repuestos (Kobayashi *et al.*, 2003). Aunado a esto, Escobar *et al.* (2006) y Suryawan *et al.* (2008) describen que en cerdos la expresión de genes como el eIF2B y el eIF4e podrían influenciar la síntesis de proteína en el músculo esquelético, por lo que se postularon las hipótesis de trabajo descritas en el apartado III.

### **III. HIPÓTESIS**

El consumo de dietas elaboradas con sorgos con niveles altos de taninos y kafirinas afectará negativamente el desarrollo posdestete del tracto digestivo de lechones. En los cerdos en crecimiento y finalización, el consumo de estas dietas afectará negativamente la integridad de la mucosa intestinal y la actividad enzimática de proteasas pancreáticas, y consecuentemente el comportamiento productivo y la síntesis de proteína muscular esquelética.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del nivel de taninos y/o kafirinas del sorgo sobre el desarrollo productivo y morfofisiológico del tracto digestivo en cerdos en diferentes etapas de crecimiento.

### 4.2. Objetivos particulares

- 1) Evaluar en lechones recién destetados el efecto del consumo de dietas elaboradas con sorgos con diferentes niveles de taninos sobre:
  - El peso relativo del páncreas, estómago, hígado e intestino delgado;
  - El pH del contenido del estómago, duodeno, yeyuno e íleon;
  - La actividad enzimática de la tripsina;
  - La altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas del duodeno, yeyuno e íleon.
- 2) Evaluar en cerdos en crecimiento el efecto del consumo de dietas elaboradas con sorgos con diferentes niveles de taninos y kafirinas sobre:
  - El peso relativo del hígado y páncreas;
  - El pH del contenido del estómago, yeyuno, íleon, ciego y colon;
  - La actividad enzimática de la tripsina y quimiotripsina;
  - La altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas del duodeno, yeyuno e íleon, así como la profundidad de criptas del ciego y colon;
  - La presencia de kafirinas en la digesta ileal.
- 3) Evaluar en cerdos en crecimiento-finalización el efecto del consumo de dietas elaboradas con sorgos con diferentes niveles de taninos y kafirinas sobre:
  - El comportamiento productivo;
  - La expresión de los genes eIF2B1 y eIF4e en el músculo gran dorsal (*longissimus dorsi*).

## **V. METODOLOGÍA**

El proyecto de tesis estuvo conformado por tres etapas experimentales, para responder la hipótesis planteada y cumplir con los objetivos particulares. Los resultados se plasmaron en tres manuscritos independientes, por lo que en cada uno se incluye la metodología, resultados, discusión, conclusiones y literatura utilizada en su desarrollo.

En el Anexo 1 se presenta el artículo “Efecto del nivel de taninos del sorgo y del día posdestete sobre algunas características morfofisiológicas del aparato digestivo de lechones”. En este experimento se emplearon lechones recién destetados y se evaluó el efecto del consumo de dietas elaboradas con sorgos con diferentes niveles de taninos sobre diversas variables morfofisiológicas del tracto digestivo. Este artículo está publicado en la revista: Archivos Latinoamericanos de Producción Animal.

En el Anexo 2 se presenta el artículo “Gastrointestinal morphophysiology and presence of kafirins in ileal digesta in growing pigs fed sorghum-based diets”, en donde se emplearon cerdos al inicio de la etapa de crecimiento y se evaluó el efecto del consumo de sorgos con diferentes niveles de taninos y kafirinas sobre algunas variables morfofisiológicas del tracto digestivo y la presencia de kafirinas en el contenido ileal. Este artículo se publicará a la revista: Journal of Applied Animal Research, y actualmente está disponible en línea con el DOI asignado: 10.1080/09712119.2017.1371607.

En el Anexo 3 titulado “Efecto del nivel de taninos y kafirinas del sorgo en la expression de los genes eIF2B1 y eIF4e en cerdos en crecimiento-finalización”, se presentan los resultados del experimento en el cuál se evaluó el comportamiento productivo y la expresión de dos genes relacionados con el inicio de la síntesis de la proteína muscular en cerdos en la fase de crecimiento y finalización, los cuáles consumieron dietas elaboradas con sorgos con diferentes niveles de taninos y kafirinas. Este artículo se presenta en forma de borrador.

## **VI. CONCLUSIONES GENERALES**

- La inclusión de un sorgo alto en taninos no causó un efecto detrimental sobre las características morfofisiológicas del tracto digestivo en lechones, independientemente del día posdestete estudiado.
- El incremento de la actividad de la tripsina pancreática en los cerdos en crecimiento que consumieron los sorgos altos en taninos y kafirinas, y la alta concentración de kafirinas en los contenidos ileales de cerdos que consumieron dietas con un elevado nivel de kafirinas, indican que probablemente la digestibilidad de estas proteínas se reduce en la medida que se incrementa su nivel en los granos de sorgo. Esta deducción deberá ser comprobada experimentalmente.
- En cerdos en crecimiento-finalización el nivel de kafirinas de los sorgos de la dieta no comprometió el comportamiento productivo, mientras que el elevado nivel de taninos de los sorgos afectó negativamente el consumo diario de alimento. Los niveles elevados de taninos y kafirinas no afectaron la síntesis de proteína en el músculo longuísimo dorsal, en lo que respecta a la expresión de los genes eIF2B1 y eIF4e. Esto probablemente fue debido a la formulación de la dieta en base a aminoácidos digestibles, la cual cubrió de manera adecuada el requerimiento de aminoácidos del cerdo.

## **VII.       IMPLICACIONES**

- En la etapa posdestete los lechones pasan por una etapa de adaptación fisiológica, lo que les permite aprovechar de manera eficiente los nutrientes dietarios, a pesar del nivel de taninos que contengan los sorgos que consuman.
- No sólo el nivel de taninos, sino la combinación de elevados niveles de taninos y kafirinas en el grano del sorgo consumido, podrían afectar algunas variables productivas y fisiológicas, por lo que esta observación deberá seguir siendo evaluada experimentalmente.
- El sorgo mostró ser un cereal que puede ser utilizado en las dietas para cerdos desde el destete hasta la etapa de crecimiento y finalización, al igual que el maíz.



## VIII. LITERATURA CITADA

- Andersen HJ, Oksbjerg N, Young JF, Therkildsen M. 2005. Feeding and meat quality-a future approach. *Meat Sci.* 70: 543-554.
- Anindo RH, Ellis M, Braña VD. 2015. Nitrogen balance, ammonia and odor emissions in growing pigs fed reduced protein diets. *Rev Mex Cienc Pecu.* 6(2): 119-136.
- Asquith TN, Izuno CC, Butler LG. 1983. Characterization of the condensed tannin (proanthocyanidin) from a group II sorghum. *J Agric Food Chem.* 31: 1299-1303.
- Avellaneda CJH. 1999. Efecto de cuatro sorgos con diferentes niveles de taninos sobre la digestibilidad ileal de la proteína, aminoácidos y actividad enzimática en cerdos en crecimiento. Tesis. UNAM. FES Cuautitlán. México. 13-23.
- Avruch J, Belham C, Weng Q, Hara K, Yonezawa K. 2001. The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 115-154.
- Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, Ortiz-Vega S, Yonezawa K. 2006. Insulin and amino acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene.* 25 (48): 6361-6372.
- Badui DS. 2006. Química de los alimentos. 4 ed. Pearson educación. México. Pp. 716.
- Baker DH, Kats RS, Easter RA. 1975. Lysine requirement of growing pigs at two levels of dietary protein. *J Anim Sci.* 40:851-856.
- Baker DH. 2005. Tolerance for branched-chain amino acids in experimental animals and humans. *J Nutr.* 135: 1585S-1590S.
- Banks WJ. 1996. Histología veterinaria aplicada. Manual moderno. 2 ed. México. Pp. 750.
- Bannink A, Dijkstra J, Koopmans S-J, Mroz Z. 2006. Physiology, regulation and multifunctional activity of the gut wall, a rationale for multicompartamental modelling. *Nutr Res Rev.* 19: 227-253.

- Bansal S, Mishra A, Tomar A, Sharma S, Kumar Khanna V, Krishan GG. 2008. Isolation and temporal endospermal expression of  $\gamma$ -kafirin gene of grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) var. M 35-1 for introgression analysis of transgene. J Cereal Sci. 48: 808-815.
- Bauer E, Metzler-Zebeli BU, Verstegen WA, Mosenthin R. 2011. Intestinal gene expression in pigs: effects of reduced feed intake during weaning and potential impact of dietary components. Nutr Res Rev. 24: 155-175.
- Baxter NJ, Lilley TH, Haslam E, Williamson MP. 1997. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. Biochemistry. 36: 5566-5577.
- Belmar CR, Nava MR. 2005. Factores antinutricionales en la alimentación de animales monogástricos. Curso preevento: Alimentación no convencional para monogástricos en el trópico. UNELLEZ. Venezuela. 51-61 Pp.
- Belton PS, Delgadillo I, Halford NG, Shewry PR. 2006. Kafirin structure and functionality. J Cereal Sci. 44: 272-286.
- Benito J, Vázquez C, Menaya C, Ferrara JL, García-Casco JM, Silio L, Rodriganez J, Rodríguez MC. 2000. Evaluation of the productive parameters in different strains of iberian pig. In: CIHEAM (Eds), Tradition and innovation in Mediterranean pig production. 41: 113-121. Zaragoza.
- Berkers CR, Maddocks ODK, Cheung EC, Mor I, Vousden KH. 2013. Metabolic regulation by p53 family members. Cell Metab. 18(5): 617-633.
- Bhattacharya A, Rice N, Shapter FM, Norton SL, Henry RJ. 2011. Chapter 9 Sorghum. En: Wild crop relatives: genomic and breeding resources cereals (Kole C editor). Springer. 397-406 Pp.
- Black JL, Hughes RJ, Nielsen SG, Tredrea AM. 2005. The energy value of cereal grains, particularly wheat and sorghum, for poultry. Aust Poult Sci Symp. 17: 21-29.
- Blättler SM, Cunningham JT, Verdeguer F, Chim H, Haas W, Liu H, Romanino K, Ruegg MA, Gygi SP, Shi Y, Puigserver P. 2012. Yin Yang 1 deficiency in skeletal muscle protects against rapamycin-induced diabetic-

like symptoms through activation of insulin/IGF signaling. *Cell Metab.* 15: 505-517.

- Bosselmann A, Möller C, Steinhart H, Kirchgessner M, Schwars FJ. 1995. Pyridinoline cross-links in bovine muscle collagen. *J Food Sci.* 60: 953-958.
- Brameld JM, Gilmour RS, Buttery PJ. 1999. Glucose and amino acids interact with hormones to control expression of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA in cultured pig hepatocytes. *J Nutr.* 129 (7): 1298-1306.
- Brameld JM, Weller PA, Saunders JC, Buttery PJ, Gilmour RS. 1995. Hormonal control of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor (GHR) mRNA expression by porcine hepatocytes in culture. *J Endocrinol.* 146: 239-245.
- Braun RO, Pattacini SH, Scoles GE, Cervellini JE. 2007. Productividad y calidad de grasa corporal en cerdos alimentados con cereales crudos y extruidos. *Arch Zootec.* 56: 299-308.
- Browne GJ, Proud CG. 2002. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur J Biochem.* 269: 5360-5368.
- Burrin DG, Stoll B, Jiang R, Chang X, Hartmann B, Juul HJ, Greeley GH, Reeds PJ. 2000. Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal piglets: how much is enough?. *Am J Clin Nutr.* 71: 1603-1610.
- Butler LG, Riedl DJ, Lebryk DG, Blytt HJ. 1984. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. *J Am Oil Chem Soc.* 61: 916-920.
- Cagampang GB, Kirleis AW. 1984. Relationship of sorghum grain hardness to selected physical and chemical measurements of grain quality. *Cereal Chem.* 61: 100-105.
- Carrol JA, Buonomo FC, Becker BA, Matteri RL. 1999. Interactions between environmental temperature and porcine growth hormone (pGH) treatment in neonatal pigs. *Domest Anim Endocrinol.* 16: 103-113.

- Casas GA, Rodríguez D, Afanador TG. 2010. Propiedades matemáticas del modelo de Gompertz y su aplicación al crecimiento de los cerdos. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 23: 349-258.
- CGG (Coordinación General de Ganadería). 2009. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de porcino en México 2009. SAGARPA, Coordinación General de Ganadería. Accesado el 27 de septiembre del 2016, en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situacin%20actual%20y%20perspectiva/Attachments/27/sitpor09a.pdf>
- Chamba EB, Halford NG, Forsyth J, Wilkinson M, Shewry PR. 2005. Molecular cloning of  $\beta$ -kafirin, a methionine-rich protein of sorghum grain. *J Cereal Sci.* 41:381-383.
- Chandrashekar A, Mazhar H. 1999. The biochemical basis and implications of grain strength in sorghum and maize. *J Cereal Sci.* 30: 193-207.
- Charlton AJ, Baxter NJ, Khan L, Moir AJG, Haslam E, Davies AP, Williamson MP. 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J Agric Food Chem.* 50: 1593-1601.
- Chaveroux C, Eichner LJ, Dufour CR, Shatnawi A, Khoutorsky A, Bourque G *et al.* 2013. Molecular and genetic crosstalks between mTOR and ERR $\alpha$  are key determinants of rapamycin-induced nonalcoholic fatty liver. *Cell Metab.* 17: 586-598.
- Chibber BAK, Mertz ET, Axtell JD. 1980. *In vitro* digestibility of high-tannin sorghum at different stages of dehulling. *J Agric Food Chem.* 28: 160-161.
- Chuck-Hernández C, Pérez CE, Heredia OE, Serna SO. 2011. Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: tecnologías y avances de oportunidad. *Rev Mex Ing Quim.* 10 (3): 529-549.
- Claus R, Weiler U. 1994. Endocrine regulation of growth and metabolism in the pig: a review. *Livest Prod Sci.* 37: 245-260.
- Coffey RT, Shi Y, Long MJC, Marr IMT, Hedstrom L. 2016. Ubiquitin-mediated small molecule inhibition of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. *J Biological Chem.* 291 (10): 5221-5233.

- Cooper GM, Hausman RE. 2007. Cooper's La célula. Marbán. 3 ed. España. Pp. 638.
- Coria HJ. 2014. Evaluación del efecto de la liofilización en la estabilidad de las propiedades físicas, químicas y termodinámicas de las proteínas de carne de cerdo. Tesis maestría. Maestría en Ciencias de la producción y de la Salud Animal. UNAM. México.
- Corino C, Musella M, Pastorelli G, Rossi R, Paolone K, Costanza L, Manchisi A, Maiorano G. 2008. Influences of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and total lysine content on growth, carcass characteristics and meat quality of heavy pigs. *Meat Sci.* 79: 307-316.
- Creighton ET. 1993. Proteins structures and molecular properties. Freeman and company. New York, USA. Pp. 507.
- Crozier SJ, Anthony JC, Schworer CM, Reiter AK, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. 2003. Tissue-specific regulation of protein synthesis by insulin and free fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285: E754-E762.
- Cybulski N, Hall MN. 2009. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem Sci.* 34: 620-627.
- D'Mello JPF. 2000. Antinutritional factors and mycotoxins. En: D'Mello JPF, Devendra C eds. *Tropical legumes in animal nutrition*. Wallingford, UK, CAB International. 135-172 Pp.
- Davis TA, Suryawan A, Orellana RA, Nguyen HV, Fiorotto ML. 2008. Postnatal ontogeny of skeletal muscle protein synthesis in pigs. *J Anim Sci.* 86 (14 suppl): E13-E18.
- De Mesa-Stonestreet JN, Alavi S, Bean SR. 2010. Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. *J Food Sci.* 75: 90- 104.
- Dendy DAV. 1995. Sorghum and the millets: production and importance. En *Sorghum and Millets: Chemistry and Technology*; Dendy, DAV, Ed. American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN. 11-26 Pp.
- Deng J, Wu X, Bin S, Li TJ, Huang R, Liu Z, Ruan Z, Deng Z, Hou Y, Yin YL. 2010. Dietary amylose and amylopectin ratio and resistant starch content

affects plasma glucose, lactic acid, hormone levels and protein synthesis in splanchnic tissues. Z Tierphysiol Tierernahr Futtermitte lkd. 94: 220-226.

- Desmoulin B. 1986. Qualité des carcasses. En: Le porc et son élevage bases scientifiques et techniques. Ed. Pérez JM, Mornet P, Rerat A. Maloine. Francia. 431-460 Pp.
- Doti S, Suárez-Belloch J, Latorre M, Guada J, Fondevila M. 2014. Effect of dietary starch source on growth performances, digestibility and quality traits of growing pigs. Livest Sci. 164: 119-127.
- Dourmand JY. 1991. Maitrise de la charge polluante des effluents des élevages porcins. Journée Régionale EDE de Bretagne. Loudéac le 20 novembre 1991. 5 pag.
- Drew MD, Schafer TC, Zijlstra RT. 2012. Glycemic index of starch affects nitrogen retention in grower pigs. J Anim Sci. 90: 1233-1241.
- Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, Fry CS, Dhanani S, Dillon EL, Sheffield-Moore M, Volpi E, Rasmussen BB. 2008. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. J Appl Physiol. 104: 1452-1461.
- Duodu KG, Nunes A, Delgadillo I, Parker ML, Mills ENC, Belton PS, Taylor JRN. 2002. Effect of grain structure and cooking on sorghum and maize *in vitro* protein digestibility. J Cereal Sci. 35: 161-174.
- Duodu KG, Taylor JRN, Belton PS, Hamaker BR. 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. J Cereal Sci. 38: 117-131.
- Dykes L, Rooney LW. 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. J cereal Sci. 44: 236-251.
- El Nour INA, Peruffo ADB, Curioni A. 1998. Characterisation of sorghum kafirins in relation to their cross-linking behaviour. J Cereal Sci. 28: 197-207.
- Eley HL, Russell ST, Baxter JH, Mukerji P, Tisdale MJ. 2007. Signaling pathways initiated by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. Am J Physiol Endocrinol Metab. 293: E923-E931.

- Elkin RG, Freed MB, Hamaker BR, Zhang Y, Parsons CM. 1996. Condensed tannins are only partially responsible for variations in nutrient digestibilities of sorghum grain cultivars. *J Agric Food Chem.* 44: 848-853.
- Emmambux NM, Taylor JRN. 2003. Sorghum kafirin interaction with various phenolic compounds. *J Sci Food Agric.* 83: 402- 407.
- Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Kimball SR, Jefferson LS, Davis TA. 2005. Physiological rise in plasma leucine stimulates muscle protein synthesis in neonatal pigs by enhancing translation initiation factor activation. *Am J Physiol.* 288: E914-E921.
- Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Kimball SR, Jefferson LS, Davis TA. 2006. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290: E612-E621.
- Fabian JR, Kimball SR, Heinzinger NK, Jefferson LS. 1997. Subunit assembly and guanine nucleotide exchange activity of eukaryotic initiation factor-2B expressed in Sf9 cells. *J Biol Chem.* 272: 12359-12365.
- Fang Y, Westbrook R, Hill C, Boparai RK, Arum O, Spong A, Wang F, Javors MA, Chen J, Sun LY, Bartke A. 2013. Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. *Cell Metab.* 17: 456-462.
- FAO y OPS. 2016. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Panamericana de la Salud. 2016 América Latina y el Caribe. Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional. Sistemas alimentarios sostenibles para poner fin al hambre y la malnutrición. Santiago. Consultado en: <http://www.fao.org/3/a-i6747s.pdf> .Fecha de consulta: 20 de enero del 2017.
- FAO. 2009. High level expert forum- How to feed the world in 2050. Roma. Consultado en: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues\\_papers/HLEF2050\\_Technology.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Technology.pdf), el día 07 de diciembre del 2015.

- FAOSTAT, 2016. Roma. Consultado en: <http://fenix.fao.org/faostat/beta/es/#data/QC>. Roma, el día 04 de septiembre del 2016)
- Farías J. 2005. Almacenamiento de sorgo en climas tropicales. Revista Claridades Agropecuarias. 138: 31-47.
- Fayyaz E, Naser M-S. 2015. Effects of reconstitution of high tannin sorghum grain on small intestine morphometry of japanese quails. Trakia J Sci. 1: 77-82.
- Fernández-Quintela A, Del Barrio AS, Macarulla MT, Martínez JA. 1998. Nutritional evaluation and metabolic effects in rats of protein isolates obtained from seeds of three legume species. J Sci Food Agric. 78: 251-260.
- Ferrando G, Boza J. 1990. Participación hormonal en el metabolismo energético. Consultado en: <http://www.insacan.org/racvao/anales/1990/articulos/02-1990-05.pdf>. (Fecha de consulta: 10 de Enero del 2016).
- Fialho ET, Rodrigues PB, Lima JAF, Silva HO, Oliveira V. 2004. Performance and nutrient digestibility of low tannin sorghum fed to pigs from 10 to 30 kg. J Anim Sci. 82 (Suppl. 1): 22.
- Fluckey JD, Knox M, Smith L, Dupont-Versteegden EE, Gaddy D, Tesch PA *et al.* 2006. Insulin-facilitated increase of muscle protein synthesis after resistance exercise involves a MAP kinase pathway. Am J Physiol Endocrinol Metab. 290: E1205-E1211.
- Fraga AL, Thomaz MC, Kronka RN, Lemos BF, Robles HR, Braga ME. 2008. Restrição alimentar qualitativa para suínos com elevado peso de abate. R Bras Zootec. 37: 869-875.
- Garcés PY. 2010. Fisiología del crecimiento y desarrollo. En: Fisiología veterinaria e introducción a la fisiología de los procesos productivos. Editores: Caballero CSC, Villa-Godoy A. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 728 .



- Garg SK, Makkar HPS, Nagal KB, Sharma SK, Wadhwa DR, Singh B. 1992. Toxicological investigations into oak (*Quercus incana*) leaf poisoning in cattle. Vet Human Toxicol. 34: 161-164.
- Gómez RS, Ángeles ML, Mariscal LG, Mejía GCA, Braña VD, Rentería FJA, Cuarón IJA. 2009<sup>a</sup>. Estrategias para el uso eficiente de materias primas en porcicultura. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP-SAGARPA. Libro Técnico No. 1, Colón, Querétaro, México.
- Gómez RS, Ángeles ML, Mejía GCA, Rentería FJA, Cuarón IJA. 2009<sup>b</sup>. Estrategias de alimentación y manejo del cerdo III. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP-SAGARPA. Publicación Técnica No. 9, Colón, Querétaro, México.
- Gómez RS, Ángeles ML, Mejía GCA, Rentería FJA. 2008. Estrategias de alimentación y manejo del cerdo II. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP-SAGARPA. Publicación Técnica No. 8, Colón, Querétaro, México.
- Gómez RS, Mariscal LG, Mejía GCA, Braña VD, Salazar GG. 2007. 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.
- Grabouski HA, Peo ER, Lewis AJ, Hancock JD. 1987. New varieties of grain sorghum are they better for swine?. Nebraska Swine Res Rep. 87: 219.
- Granner DK. 2004. Síntesis de proteínas y código genético. En: Harper. Bioquímica ilustrada. Editores: Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW. Ed. El Manual Moderno. 16 ed. México. 752 p.
- Gulati P, Thomas G. 2007. Nutrient sensing in the mTOR/S6K1 signaling pathway. Biochem Soc Trans. 35: 236-238.
- Hahn JD, Biehl RR, Baker DH. 1995. Ideal digestible lysine level for early and late finishing swine. J Anim Sci. 73: 773-784.

- Hamaker BR, Kirleis AW, Mertz ET, Axtell JD. 1986. Effect of cooking on the protein profiles and in vitro digestibility of sorghum and maize. *J Agric Food Chem.* 34: 647–649.
- Hamaker BR, Mohamed AA, Habben JE, Huang CP, Larkins BA. 1995. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chem.* 72: 583-588.
- Hayashi AA, Proud CG. 2007. The rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mTOR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292: E1647-E1655.
- Heitman J, Movva NR, Hall MN. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 253: 905-909.
- Hershey JWB, Merrick WC. 2000. *En Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 33-38 Pp.
- Hicks C, Bean SR, Lookhart GL, Pedersen JF, Kofoed KD, Tuinstra MR. 2001. Genetic analysis of kafirins and their phenotypic correlations with feed quality traits, in vitro digestibility, and seed weight in grain sorghum. *Cereal Chem.* 78: 412-416.
- Hinnebusch AG, Dever TE, Asano K. 2007. The mechanism of translation initiation in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. In: Mathews MB, Sonenberg N y Hershey JWB eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 225-268 Pp.
- Hinnebusch AG. 2005. Translational regulation of GCN 4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol.* 59: 407-450.
- Hinson RB, Wiegand BR, Ritter MJ, Alle GL, Carr SN. 2011. Impact of dietary energy level and ractopamine on growth performance, carcass characteristics, and meat quality of finishing pigs. *J Anim Sci.* 89: 3572-3579.
- Hiyama TB, Ito T, Imataka H, Yokoyama S. 2009. Crystal structure of the  $\alpha$  subunit of human translation initiation factor 2B. *J Mol Biol.* 392: 937-951.

- Hosenev RC. 1994. Principles of Cereal Science and Technology. 2 ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. 139-141.
- Ibar L. 1984. El sorgo. Cultivo y aprovechamiento. Aedos, Barcelona, España. 161 p.
- Ioerger B, Bean SR, Tuinstra MR, Pedersen JF, Erpelding J, Lee KM, Herrman TJ. 2007. Characterization of polymeric proteins from vitreous and floury sorghum endosperm. J Agric Food Chem. 55: 10232- 10239.
- Jackson RJ. 2005. Alternative mechanism of initiating translation of mammalian mRNAs. Biochemical Society Transactions. 33: 1231-1241.
- Jansman AJM, Enting H, Verstegen MWA, Huisman J. 1994. Effect of condensed tannins in hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) on the activities of trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1) in digesta collected from the small intestine of pigs. Br J Nutr. 71: 627-641.
- Jansman AJM, Verstegen MWA, Huisman J. 1993. Effects of dietary inclusion of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low and high tannin content of condensed tannins on digestion and some physiological parameters in piglets. Anim Feed Sci Technol. 43: 239-257.
- Jeyapalan AS, Orellana RA, Suryawan A, O'Connor PMJ, Nguyen HV, Escobar J, Frank JW, Davis TA. 2007. Glucose stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs through an AMPK-and mTOR-independent process. Am J Physiol Endocrinol Metab. 293: E595-E603.
- Jezierny D, Mosenthin R, Bauer E. 2010. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. Anim Feed Sci Technol. 157: 111-128.
- Jezierny D, Mosenthin R, Sauer N, Roth S, Piepho HP, Rademacher M, Eklund M. 2011. Chemical composition and standardized ileal digestibilities of crude protein and amino acids in grain legumes for growing pigs. Livest Sci. 138: 229-243.
- Jiao Q, Lei M, Wang L. 2011. Developmental expression changes of the genes involved in IGFI signaling pathway in longissimus dorsi muscle of

Tongcheng and Yorkshire pigs during postnatal growth. *Mol Biol Rep.* 38: 5133-5138.

- Johns CO, Brewster JF. 1916. Kafir, an alcohol-soluble protein from kafir, andropogon sorghum. *J Biol Chem.* 28: 59-65.
- Jondreville C, Van Den Broecke J, Gátel F, Grosjean F, Van Cauwenberghe S, Seve B. 2001. Ileal digestibility of amino acids and estimates of endogenous amino acid losses in pigs fed wheat, triticale, rye, barley, maize and sorghum. *Anim Res.* 50: 119-134.
- Jones DB, Stahly TS. 1999. Impact of amino acid nutrition during lactation on body nutrient mobilization and milk nutrient output in primiparous sows. *J Anim Sci.* 77: 1513-1522.
- Joshi B, Lee K, Maeder DL, Jagus R. 2005. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol.* 5: 48-68.
- Juncher D, Ronn B, Mortensen ET, Henckel P, Karlsson A, Skibsted LH, Bertelsen G. 2001. Effect of pre-slaughter physiological conditions of the oxidative stability of colour and lipid during chill storage on pork. *Meat Sci.* 58: 347-357.
- Kakuta Y, Tahara M, Maetani S, Yao M, Tanaka I, Kimura M. 2004. Crystal structure of the regulatory subunit of archaeal initiation factor 2B (aIF2B) from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3: A proposed structure of the regulatory subcomplex of eukaryotic IF2B. *Biochem Biophys Res Commun.* 319: 725-732.
- Kerr BJ, Easter RA. 1995. Effect of feeding reduced protein, amino acid-supplemented diets on nitrogen and energy balance in grower pigs. *J Anim Sci.* 73: 3000-3008.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.* 110: 163-175.
- Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS. 2002. Exercise effects on muscle insulin signaling and action. Invited review: Role of insulin in translational

control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol.* 93: 1168-1180.

- Kimball SR, Farrell PA, Nguyen HV, Jefferson LS, Davis TA. 2001. Developmental decline in components of signal transduction pathways regulating protein synthesis in pig muscle. *Am J. Physiol Endocrinol Metab.* 282: E585-E592.
- Kimball SR, Jefferson LS, Nguyen HV, Suryawan A, Bush JA, Davis TA. 2000. Feeding stimulates protein synthesis in muscle and liver of neonatal pigs through an mTOR-dependent process. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279: E1080-E1087.
- Kimball SR, Jefferson LS. 2005. Role of amino acids in the translational control of protein synthesis in mammals. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 16: 21-27.
- Kimball SR, Orellana RA, O'Connor MJ, Suryawan A, Bush JA, Nguyen HV *et al.* 2003. Endotoxin induces differential regulation of mTOR-dependent signaling in skeletal muscle and liver of neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285: E637-E644.
- Kobayashi H, Børsheim E, Anthony TG, Traber DL, Badalamenti J, Kimball SR, Jefferson LS, Wolfe RR. 2003. Reduced amino acid availability inhibits muscle protein synthesis and decreases activity of initiation factor eIF2B. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284: 488-498.
- Kong XF, Tan BE, Yin YL, Li XL, Jaeger LA, Bazer FW, Wu GY. 2012. Arginine stimulates the mTOR signaling pathway and protein synthesis in porcine trophectoderm cells. *J Nutr Biochem.* 23 (9): 1178-1183.
- Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FLC, Merrick WC, Rhoads RE. 2001. Characterization of the two eIF4A-binding sites on human eIF4G-1. *J Biol Chem.* 276: 2872-2879.
- Kusina J, Pettigrew JE, Sower AF, White ME, Crooker BA, Hathaway MR. 1999. Effect of protein intake during gestation and lactation on the lactational performance of primiparous sows. *J Anim Sci.* 77: 931-941.

- Lang CH, Frost RA, Deshpande N, Kumar V, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. 2003. Alcohol impairs leucine-mediated phosphorylation of 4E-BP1, S6K1, eIF4G, and mTOR in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285: E1205-E1215.
- Lang CH. 2006. Elevated plasma free fatty acids decrease basal protein synthesis, but not the anabolic effect of leucine, in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291: E666-E674.
- Laplante M, Sabatini DM. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 149: 274-293.
- Lee SH, Shinde PL, Choi JY, Kwon IK, Lee JK, Pak SI, Cho WT, Chae BJ. 2010. Effects of tannic acid supplementation on growth performance, blood hematology, iron status and faecal microflora in weanling pigs. *Livestock Sci.* 131: 281-286.
- Lewis AJ. 1992. Determination of the amino acids requirement of animals. In: *Modern methods in protein nutrition and metabolism.* Ed. S. Nissen. Academic Press, Inc. 67-86 Pp.
- Li F, Yin Y, Tan B, Kong X, Wu G. 2011. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. *Amino Acids.* 41: 1185–1193.
- Liu B, Qian S-B. 2011. Translational regulation in nutrigenomics. *Adv Nutr.* 2: 511-519.
- Liu JG, Zhang P, Bin SY. 2007. Effects of different dietary starch constituents on level of blood glucose and insulin of weaned piglets (article in Chinese). *Food Sci.* 28: 315-319.
- Liu SY, Selle PH, Aaron J, Cowieson J. 2013. Strategies to enhance the performance of pigs and poultry on sorghum-based diets. *Anim Feed Sci Technol.* 183: 175-183.
- Liu LY, Wang J, Huang Y, Pan HB, Zhang X, Huang ZX, Zhao SM, Gao SZ. 2014. The effect of dietary protein levels on the expression of genes coding for four selected protein translation initiation factors in muscle tissue of Wujin pig. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 98: 310-317.

- Machín RP, Rodríguez DY, Vega HMC. 2006. La ruta mTOR como diana terapéutica. Biocáncer. 3: 1-22.
- Mariscal LG. 1994. Alimentación y calidad de la canal. XVII Simposium de ganadería tropical. Retos actuales de la porcicultura tropical y temas selectos de apicultura. Veracruz. 15-30 Pp.
- Mariscal-Landín G, Avellaneda JH, Reis STC, Aguilera BA, Borbolla GA, Mar B. 2004. Effect of tannins in sorghum on amino acid ileal digestibility and on trypsin (E.C.2.4.21.4) and chymotrypsin (E.C.2.4.21.1) activity of growing pigs. Anim Feed Sci Technol. 117: 245-264.
- Mariscal-Landín G, Reis DSTC, Avalos MA. 2010. Ileal amino acids digestibility of sorghum in weaned piglets and growing pigs. Animal. 8: 1341-1348.
- Marom L, Ulitsky I, Cabilly Y, Shamir R, Elroy-Stein O. 2011. A point mutation in translation initiation factor eIF2B leads to function-and time-specific changes in brain gene expression. PLoS ONE. 6 (10): 1-11.
- Martínez S, Campos C, Madrid J, Cerón JJ, Orengo J, Tvarijonaviciute A, Valera L, Hernández F. 2013. Conocimiento actual de las hormonas reguladoras de la ingestión de alimentos en la especie porcina. An Vet (Murcia). 29: 7-22.
- Mayhew DL, Hornberger TA, Lincoln HC, Bamman MM. 2011. Eukaryotic initiation factor 2B epsilon induces cap-dependent translation and skeletal muscle hypertrophy. J Physiol 589: 3023-3037.
- Mazhar H, Chandrashekar A, Shetty HS. 1993. Isolation and immunochemical characterization of alcohol-extractable proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. J Cereal Sci. 17: 83- 93.
- Mazhar H, Chandrashekar A. 1995. Quantification and distribution of kafirins in the kernels of sorghum cultivars varying in endosperm hardness. J Cereal Sci. 21: 155- 162.
- Mehansho H, Clements S, Sheare BT, Smith S, Carlson DM. 1985. Induction of proline-rich glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannins. J Biol Chem. 260: 4418-4423.

- Mejía GCA, Cuarón IJA, Rentería FJA, Braña VD, Mariscal LG, Gómez RS. 2007. Alimentación del hato reproductor porcino. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP-SAGARPA. Libro científico No. 1. Colón, Qro. México.
- Merrick WC. 2015. eIF4F: a retrospective. J Biological Chem. 290(40): 24091-24099.
- Millward J. 1997. Human amino acid requirements. J Nutr. 127: 1842-1846.
- Mortimore GE, Kadowaki M. 2001. Regulation of protein metabolism in liver. In: The endocrine pancreas and regulation of metabolism (Jefferson LS, Sherrington AD, eds.), Handbook of physiology, Section 7, The endocrine system , Volume II, American Physiological Society, Oxford University Press. 553-577 Pp.
- Mossé J, Huet J-C, Baudet J. 1988. The amino acid composition of whole sorghum grain in relation to its nitrogen content. Cereal Chem. 65: 271-277.
- Naurato N, Wong P, Lu Y, Wroblewski K, Bennick A. 1999. Interaction of tannin with human salivary histatins. J Agric Food Chem .47: 2229-2234.
- Niinivaara FP, Antila P. 1973. El valor nutritivo de la carne. Acribia. España. Pp 184.
- NRC (Nutrient requirements of swine). 1998. 10 ed. National Academy Press, Washington, DC.
- NRC (Nutrient requirements of swine). 2012. 11 ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Nunes A, Correia I, Barros A, Delgadillo I. 2005. Characterization of kafirin and zein oligomers by preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. J Agric Food Chem. 53: 639-643.
- O'Connor PM, Kimball SR, Suryawan A, Bush JA, Nguyen HV, Jefferson LS, Davis TA. 2003a. Regulation of translation initiation by insulin and amino acids in skeletal muscle of neonatal pigs. Am J Physiol Endocrinol Metab. 285(1):E40-E53.



- O'Connor PMJ, Bush JA, Suryawan A, Nguyen HV, Davis TA. 2003b. Insulin and amino acids independently stimulate skeletal muscle protein synthesis in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284(1): E110-E119.
- Oksbjerg N, Gondret F, Vestergaard M. 2004. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domest Anim Endocrin.* 27: 219-240.
- Orellana RA, Jeyapalan A, Escobar J, Frank JW, Nguyen HV, Suryawan A, Davis T. 2007. Amino acids augment muscle protein synthesis in neonatal pigs during acute endotoxemia by stimulating mTOR-dependent translation initiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293: E1416-E1425.
- Oria MP, Hamaker BR, Axtell JD, Huang C-P. 2000. A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. *Proc Natl Acad Sci.* 97:5065-5070.
- Oria MP, Hamaker BR, Shull JM. 1995. Resistance of sorghum  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -kafirins to pepsin digestion. *J Agric Food Chem.* 43:2148-2153.
- Osman RO, Abd El Gellil FM, El-Noamany HM, Dawood MG. 2000. Oil content and fatty acid composition of some varieties of barley and sorghum grains. *Grasas y aceites.* 51: 157-162.
- Pavitt GD. 2005. eIF2B, a mediator of general and gene-specific translational control. *Biochem Soc Trans.* 33: 1487-1492.
- Pérez A, Saucedo O, Iglesias J, Wencomo HB, Reyes F, Oquendo G, Milián I. 2010. Caracterización y potencialidades del grano de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Pastos y forrajes.* 33.
- Pestova TV, Lorsch JR, Hellen CUT. 2007. The mechanism of translation initiation in eukaryotes. In: Mathews MB, Sonenberg N y Hershey JWB eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 87-128 Pp.
- Piluzza G, Sulas L, Bullitta. 2013. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass Forage Sci.* 69: 32-48.
- Pontieri P, Mamone G, De Caro S, Tuinstra MR, Roemer E, Okot J, De Vita P, Ficco DB, Alifano P, Pignone D, Massardo DR, Del Giudice L. 2013.

Sorghum, a healthy and gluten-free food for celiac patients as demonstrated by genome, biochemical, and immunochemical analyses. *J Agric Food Chem.* 61: 2565-2751.

- Ramírez RE, Anaya EAM, Mariscal LG. 2005. Predicting the chemical composition of sorghum grain by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Tec Pecu Mex.* 43: 1-11.
- Reed C. 2005. Almacenamiento de sorgo en climas tropicales. *Claridades Agropecuarias* (Farías AJR, editor). 138: 31-47.
- Reed JD. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J Anim Sci.* 73: 1516-1528.
- Regmi PR, Matte JJ, van Kempen T, Zijlstra RT. 2010. Starch chemistry affects kinetics of glucose absorption and insulin response in swine. *Livest Sci.* 134 (1-3): 44-46.
- Reis STC, Mariscal LG, Escobar GK, Aguilera BA, Magné BA. 2012. Cambios nutrimentales en el lechón y desarrollo morfofisiológico de su aparato digestivo. *Vet Méx.* 43: 155-173.
- Reyes SE, Cortéz CA, Morales BE, Ávila GE. 2000. Adición de DL-metionina en dietas con sorgo alto en taninos para pollos de engorda. *Tec Pecu Mex.* 38: 1-8.
- Rodríguez PJC. 2011. El papel de los inhibidores de mTOR en las enfermedades renales. *Nefrología.* 31 (3): 251-255.
- Rooney LW, Clark LE. 1968. The chemistry and processing of sorghum grain. *Cereal Sci Today.* 13: 259-285.
- Rooney LW, Waniska RD. 2000. Sorghum food and industrial utilization. En *Sorghum: Origin, History, Technology, and Production*; Smith, CW, Fredericksen RA, Eds.; Wiley: New York. 689-750 Pp.
- Rooyackers OE, Nair KS. 1997. Hormonal regulation of human muscle protein metabolism. *Annu Rev Nutr.* 17: 457-485.
- Rowlands AG, Panniers R, Henshaw EC. 1988. The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem.* 263: 5526-5533.

- Ruusunen M, Partanen K, Poso R, Puolanne E. 2007. The effect of dietary protein supply on carcass composition, size of organs, muscle properties and meat quality of pigs. *Livestock Sci.* 107: 170-181.
- Salazar GG. 2006. Composición química de la carne de cerdo para abasto, en relación al gen del síndrome de estrés porcino. Tesis doctoral. Posgrado interinstitucional en ciencias pecuarias. Universidad de Colima. México.
- Salinas I, Pró A, Salinas Y, Sosa E, Becerril CM, Cuca M, Cervantes M, Gallegos J. 2006. Compositional variation amongst sorghum hybrids: effects of kafirin concentration on metabolizable energy. *J Cereal Sci.* 44: 342-346.
- Santos-Buelga C, Scalbert A. 2000. Review Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric.* 80: 1094-1117.
- Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* 14: 1296-1302.
- Sato K. 2016. Molecular nutrition: interaction of nutrients, gene regulations and performances. *Animal Sci J.* 87: 857-862.
- Schinckel AP, Lange CFM. 1996. Characterization of growth parameters needed as inputs for pig growth models. *J Anim Sci.* 74: 2021-2036.
- Schinckel AP, Li N, Richert BT, Preckel PV, Einstein ME. 2003. Development of a model to describe the compositional growth and dietary lysine requirements of pigs fed ractopamine. *J Anim Sci.* 81: 1106-1119.
- Selle PH, Cadogan DJ, Li X, Bryden WL. 2010. Implications of sorghum in broiler chicken nutrition. *Anim Feed Sci Technol.* 156: 57-74.
- Serna-Saldivar S, Rooney LW. 1995. Structure and chemistry of sorghum millets. En: *Sorghum and millets. Chemistry and technology.* D.A.V. Dendy, American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN. 69-124 Pp.
- Serrano J, Puupponen-Pimia R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F. 2009. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res.* 53: 310-329.

- Shahidi F, Naczek M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. CRS PRESS. USA. 13
- Solanes FX, Grandinson K, Rydhmer L, Stern S, Andersson K, Lundeheim N. 2004. Direct and maternal influences on the early growth, fattening performance, and carcass traits of pigs. *Livest Prod Sci.* 88: 199–212
- Sonenberg N. 1996. mRNA 5'cap-binding protein eIF-4E and control of cell growth. En: Hershey J, Mathews M, Sonenberg N, eds. *Translational control.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 245-270.
- Sorrells DL, Black DR, Meschonat C, Rhoads R, De Benedetti A, Gao M, Williams BJ, Li BDL. 1997. Detection of eIF4E gene amplification in breast cancer by competitive PCR. *Ann Surg Oncol.* 5(3): 232-237.
- Spurlock DM, McDanel TG, McIntyre LM. 2006. Changes in skeletal muscle gene expression following clenbuterol administration. *BMC Genomics.* 7: 320-335.
- Srinivasa RP, Ganesh KC. 2013. Characterization of improved sweet sorghum cultivars. *Springer briefs in agriculture.* Srinivasa RP, Ganesh KC (editors). Springer. Pp. 127.
- Sumano LH, Ocampo CL, Gutiérrez OL. 2002. Clenbuterol y otros  $\beta$ -agonistas, ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?. *Vet Méx.* 33: 137-159.
- Suryawan A, Davis TA. 2014. Regulation of protein degradation pathways by amino acids and insulin in skeletal muscle of neonatal pigs. *J Anim Sci Biotechnol.* 5: 8.
- Suryawan A, Jeyapalan AS, Orellana RA, Wilson FA, Nguyen HV, Davis TA. 2008. Leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs by enhancing mTORC1 activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295: E868-E875.
- Suryawan A, O'Connor PM, Kimball SR, Bush JA, Nguyen HV, Jefferson LS, Davis TA. 2004. Amino acids do not alter the insulin-induced activation of the insulin signaling pathway in neonatal pigs. *J Nutr.* 134: 24-30.

- Suryawan A, Orellana A, Fiorotto ML, Davis TA. 2011. Triennial growth symposium: Leucine acts as a nutrient signal to stimulate protein synthesis in neonatal pigs. *J Anim Sci.* 89: 2004-2016.
- Suryawan A, Orellana RA, Nguyen HV, Jeyapalan AS, Fleming JR, Davis TA. 2007. Activation by insulin and amino acids of signaling components leading to translation initiation in skeletal muscle of neonatal pigs is developmentally regulated. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293 (6): E1597-E1605.
- Sutter BC. 1982. Hormonal regulation of insulin secretion. *J Physiol (Paris).* 78: 119-130.
- Svihus B, Uhlen AK, Harstad OM. 2005. Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: a review. *Anim Feed Sci Technol.* 122: 303-320.
- Taylor J, Bean SR, Ioerger BP, Taylor JRN. 2007. Preferential binding of sorghum tannins with  $\gamma$ -kafirin and the influence of tannin binding on kafirina digestibility and biodegradation. *J. Cereal Sci.* 46: 22-31.
- Taylor JRN, Schüssler L, Liebenberg Nvd W. 1985. Protein body formation in the starchy endosperm of developing *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds. *South African J Botany.* 51:S3-40.
- Taylor JRN, Tilman JS, Scott RB. 2006. Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *J Cereal Sci.* 44: 252-271.
- Verbruggen MA, Beldman G, Voragen AGJ, Hollemans M. 1993. Water-unextractable cell wall material from sorghum: isolation and characterization. *J Cereal Sci.* 17: 71-82.
- Vitti DMSS, Abdalla AL, Bueno ICS, Silva FJC, Costa C, Bueno MS, Nozella EF, Longo C, Vieira EQ, Cabral FSLC, Godoy PB, Mueller-Harvey I. 2005. Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. *Animal Feed Sci Technol.* 119: 345-361.
- von der Haar T, Gross JD, Wagner G, McCarthy JE. 2004. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol.* 11: 503-511.

- Wall JS, Blessin CW. 1969. Composition and structure of sorghum grains. *Cereal Sci. Today*. 6 (8): 264- 270.
- Wang X, Proud CG. 2006. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology*. 21: 362-369.
- Wang X, Qiao S, Yin Y, Yue L, Wang Z, Wu G. 2007. A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young pigs. *J Nutr*. 137: 1442-1446
- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans*. 34: 7-11.
- Wheatley SM, El-Kadi SW, Suryawan A, Boutry C, Orellana RA, Nguyen HV, Davis SR, Davis TA. 2013. Protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs is enhanced by administration of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 306: E91-E99.
- Wilson FA, Suryawan A, Orellana RA, Kimball SR, Gazzaneo MC, Nguyen HV, Fiorotto ML, Davis TA. 2009. Feeding rapidly stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs by enhancing translation initiation. *J Nutr*. 139 (10): 1873-1880.
- Wolter A, Hager AS, Zannini E, Arendt EK. 2013. *In vitro* starch digestibility and predicted glycaemic indexes of buckwheat, oat, quinoa, sorghum, teff and commercial gluten-free bread. *J Cereal Sci*. 58: 431-436.
- Wong JH, Lau T, Cai N, Singh J, Pedersen JF, Vensel WH, Hurkman WJ, Wilson JD, Lemaux PG, Buchanan BB. 2009. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *J Cereal Sci*. 49: 73-82.
- Wong JH, Marx DB, Wilson JD, Buchanan BB, Lemaux PG, Pedersen JF. 2010. Principal component analysis and biochemical characterization of protein and starch reveal primary targets for improving sorghum grain. *Plant Sci*. 179: 598-611.
- Wortham NC, Martinez M, Gordiyenko Y, Robinson CV, Proud CG. 2014. Analysis of the subunit organization of the eIF2B complex reveals new insights into its structure and regulation. *FASEB J*. 28: 2225-2237.

- Wortham NC, Proud CG. 2015. Biochemical effects of mutations in the gene encoding the alpha subunit of eukaryotic initiation factor (eIF) 2B associated with Vanishing White Matter disease. *BMC Med Genet.* 16: 64-72.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 124: 471-484.
- Xia X, Kong B, Liu Q, Liu J. 2009. Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze-thaw cycles. *Meat Sci.* 83: 239-245.
- Xiao J, Li Y, Li J, Perez GA, Xia Q, Huang Q. 2015. Structure, morphology, and assembly of kafirin. *J Agric Food Chem.* 63: 216-224.
- Yamaoka I, Doi M, Nakayama M, Ozeki A, Mochizuki S, Sugahara K, Yoshizawa F. 2005. Intravenous administration of amino acids during anesthesia stimulates muscle protein synthesis and heat accumulation in the body. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290: E882-E888.
- Yao K, Yin Y, Chu W, Liu Z, Deng D, Li T, Huang R, Zhang J, Tan B, Wang W, Wu G. 2008. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J Nutr.* 138 (5): 867-872.
- Yin F, Yin Y, Hou Y. 2013. Synthesis and degradation of protein in pigs. In: *Nutritional and physiological functions of amino acids in pigs.* Blachier F, Wu G, Yin Y (eds.). Springer
- Yin F, Yin Y, Zhang Z, Xie M, Huang J, Huang R, Li T. 2011. Digestion rate of dietary starch affects the systemic circulation of lipid profiles and lipid metabolism-related gene expression in weaned pigs. *Br J Nutr* 106: 369–377
- Yin F, Zhang Z, Huang J, Yin Y. 2010. Digestion rate of dietary starch affects systemic circulation of amino acids in weaned pigs. *Br J Nutr.* 103: 1404–1412.

## **ANEXOS**

### **8.1. Anexo 1**

Gómez-Soto JG, Aguilera BA, Escobar García K, Mariscal-Landín G, Reis de Souza TC. 2015. Efecto del nivel de taninos del sorgo y del día posdestete sobre algunas características morfofisiológicas del aparato digestivo de lechones. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 23(2): 63-70.



## Efecto del nivel de taninos del sorgo y del día posdestete sobre algunas características morfofisiológicas del aparato digestivo de lechones

J. G. Gómez-Soto, A. B. Aguilera, K. Escobar García, G. Mariscal-Landín<sup>1</sup>, T. C. Reis de Souza<sup>2</sup>

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro,  
Av. de las Ciencias s/n. Juriquilla. CP 76230. Querétaro, Qro., México.  
Recibido Enero 02, 2014. Aceptado Agosto 09, 2015.

### Effect of sorghum tannin levels and postweaning day on some morphophysiological characteristics of the digestive tract of piglets

**Abstract.** An experiment was conducted with piglets to evaluate the effect of dietary sorghum tannin level on trypsin activity, digesta pH, weight of digestive organs, and intestinal morphology. Sixteen weaned (at 28 days of age) Duroc x Landrace piglets (eight per treatment) were fed, from postweaning until slaughter, either a diet with low-tannins sorghum (SBT) or one with high-tannins sorghum (SAT). Four animals per treatment were slaughtered on each of days 3 and 16 postweaning. Also, four piglets were slaughtered at weaning (day 0) as a control group. There were not effects ( $P>0.05$ ) of dietary tannin level on pancreatic trypsin activity; development of pancreas, stomach, liver, and small intestine; pH of digesta in stomach, duodenum, jejunum, and ileum; and morphology of intestinal villi and crypts. The variables weight at sacrifice and relative weight of digestive organs, excepting liver, were affected ( $P<0.05$ ) by days after weaning (0, 3 or 16), being highest at d 16. Ingesta pH in all four parts of the digestive tract was also affected ( $P<0.05$ ) by days postweaning, with significant differences as follows: stomach, max. at d 0 and min. at d 3; duodenum, max. at d 16 and min at d 3; jejunum, max. at d 3 and min at d 0 and 16; ileum, max at d 3 and min at d 16. Crypt depth in jejunum and ileum was greater ( $P<0.05$ ) at d 16 than at d 3 postweaning. In conclusion, dietary tannins did not impact negatively the morphological and physiological characteristics studied. The changes observed suggest a digestive adaptation to starter feed.

**Key words:** Digestive pH, Intestinal morphology, Piglets, Sorghum, Tannins, Trypsin

**Resumen.** Se realizó un experimento con lechones para evaluar el efecto del nivel dietético de los taninos de sorgos sobre la actividad de tripsina, el pH de los contenidos digestivos, peso de varios los órganos digestivos y morfología intestinal. Diez y seis lechones (ocho por tratamiento experimental), de raza Duroc x Landrace, destetados a los 28 días de edad, se alimentaron luego del destete y hasta el sacrificio, con una dieta formulada con sorgo bajo en taninos (SBT) u otra a base de sorgo alto en taninos (SAT). Se sacrificaron cuatro animales por tratamiento a los 3 días y otra vez a los 16 días posdestete. Adicionalmente, se sacrificaron cuatro lechones al destete (día 0) como grupo testigo. El nivel dietético de taninos no afectó ( $P<0.05$ ) la actividad de tripsina a nivel pancreático, el desarrollo posdestete del páncreas, estómago, hígado e intestino delgado; el pH del contenido del estómago, duodeno, yeyuno e ileon; ni la morfología de las vellosidades y criptas intestinales. Las variables peso al sacrificio y peso relativo de los órganos digestivos, excepto el hígado, acusaron efecto ( $P<0.05$ ) de los días posdestete (0, 3 ó 16), sobresaliendo los valores a los 16 d. El pH de los contenidos de los cuatro segmentos del tubo digestivo también se afectaron ( $P<0.05$ ) por los días posdestete, habiendo las siguientes diferencias significativas: el estómago, mayor al día 0 y menor al día 3; duodeno, mayor al día 16 y menor al día 3; yeyuno, mayor al día 3 y menor a los días 0 y 16; ileon mayor al día 3 y menor al día 16. La profundidad de las criptas en el

<sup>1</sup>Autor para la correspondencia, e-mail: [tercia@uaq.mx](mailto:tercia@uaq.mx)

<sup>2</sup>CENID Fisiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. km 1 Carretera a Ajuchitlán. CP 76280. Colón, Qro., México.

<sup>3</sup>Autor para la correspondencia: Tércia Cesária Reis de Souza

yeyuno e íleon fue mayor ( $P < 0.05$ ) al día 16 que al día 3 posdestete. Se concluye que los taninos de sorgo no afectaron negativamente las características morfológicas y fisiológicas estudiadas. Los cambios observados hacen suponer una adaptación digestiva al consumo de la dieta iniciadora.

**Palabras clave:** Lechones, Morfología intestinal, pH de contenidos digestivos, Sorgo, Taninos, Tripsina

## Introducción

En la alimentación del lechón, la principal fuente de energía de las dietas iniciadoras son los carbohidratos de los granos de cereales, tales como maíz, sorgo, trigo, avena y sus subproductos (Reis de Souza *et al.*, 2012). El sorgo ocupa el quinto lugar mundial entre los granos de mayor importancia económica y se considera un cultivo alimenticio primario en los trópicos semiáridos de Asia, África y Sudamérica, ya que se cultiva en áreas secas con poca humedad en el suelo (Rodríguez *et al.*, 2002; Etuk *et al.*, 2012). En México el sorgo es el cereal más utilizado en la alimentación animal. Según Fialho *et al.* (2002) el sorgo bajo en taninos puede ser utilizado para reemplazar al maíz en dietas para cerdos en crecimiento, sin afectar los parámetros productivos.

Sin embargo, existen reportes de que los taninos presentes en algunos híbridos de sorgo afectan negativamente la digestibilidad de la proteína y aminoácidos (Mariscal-Landín *et al.*, 2010), al inhibir la digestión de la dieta (Meharsho *et al.*, 1987); lo que limita la inclusión del sorgo en raciones iniciadoras para lechones (Reis de Souza *et al.*, 2005). Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto del uso de sorgo rico en taninos sobre la fisiología digestiva del lechón; por lo que el presente estudio tuvo como finalidad evaluar el efecto del nivel de taninos del sorgo incluido en dietas para lechones y también el efecto de los días posdestete sobre la actividad de la enzima tripsina pancreática, el pH de los contenidos del intestino delgado, el peso de los órganos digestivos y la morfología intestinal.

## Materiales y Métodos

El experimento se realizó en la unidad metabólica de la granja experimental del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología (CENID-Fisiología) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Los análisis químicos y bromatológicos se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma de Querétaro. El manejo empleado en los animales durante la experimentación respetó en todo momento los lineamientos de la *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (CIOMS, 1985), así como los de la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Diario Oficial, 2001).

### Animales

Se utilizaron 20 lechones híbridos Duroc x Landrace destetados a los  $28 \pm 1$  días de edad, con un peso vivo (PV) promedio de  $9.3 \pm 1.0$  kg. El PV al destete se analizó mediante un ANOVA y no varió entre los cerdos asignados a los dos diferentes tratamientos experimentales ( $P > 0.05$ ). Los lechones no consumieron dieta sólida previo al destete. Dieciséis lechones se distribuyeron al azar entre los dos tratamientos experimentales (dietas); se alojaron (cuatro lechones por jaula) en una sala de ambiente controlado por un calentador de gas y ventilación natural, en jaulas elevadas con piso de rejilla de plástico, con una

superficie total de  $1.6 \text{ m}^2$ , cada jaula contaba con un comedero tipo tolva con seis bocas y un bebedero de chupón. Los lechones se recibieron al destete a una temperatura ambiental de  $30^\circ\text{C}$  y en la segunda semana experimental se mantuvieron a  $26^\circ\text{C}$ .

### Dietas y Manejo Experimental

Se formularon dos dietas (tratamientos experimentales) utilizando dos híbridos de sorgo (Cuadro 1). La dieta baja en taninos (SBT) se formuló con el sorgo Dekalb D-69, el cual contenía menos de 0.02% de taninos condensados; y la alta en taninos (SAT), se formuló con el sorgo Pioneer 8172, el cual contenía 4.72% de taninos condensados. Dicho contenido se obtuvo mediante extracción con metanol (Price *et al.*, 1978).

Las dietas se formularon para proporcionar los requerimientos de energía metabolizable, proteína y aminoácidos digestibles recomendados por el NRC (1998).

Los lechones tuvieron libre acceso al agua y al alimento; se pesaron al destete y en cada día de sacrificio.

### Obtención de muestras

El sacrificio se realizó al destete (día cero, cuatro lechones como grupo control) y en los días 3 y 16 posdestete (cuatro lechones de cada tratamiento en cada día). Los lechones se insensibilizaron por

Cuadro 1. Formulación de las dietas experimentales

Ingrediente (%)	Dieta <sup>1</sup>	
	SBT	SAT
Sorgo	52.336	52.336
Lactosa	20.619	20.619
Caseína	19.242	19.242
Aceite de maíz	3.000	3.000
Sal común	0.500	0.500
Carbonato de calcio	0.634	0.634
Ortofosfato	2.289	2.289
Óxido de zinc	0.400	0.400
Tilosina	0.500	0.500
Vitaminas <sup>2</sup>	0.360	0.360
Minerales <sup>3</sup>	0.120	0.120
<b>Composición química</b>		
MS <sup>4</sup>	91.5	91.3
PC <sup>4</sup>	22.7	21.4
EM <sup>5</sup>	3.4	3.4

<sup>1</sup>SAT: dieta con sorgo alto en taninos. SBT: dieta con sorgo bajo en taninos.

<sup>2</sup>Cada kg de producto contiene: Vitamina A 10.20 UI, Vitamina D 1.98 UI, Vitamina E 0.06 UI, Vitamina K 1.20 mg, Riboflavina (B2) 7.20 mg, Vitamina B (cianocobalamina) 0.04 mg, Colina 968.58 mg, Niacina 36 mg, Ácido Pantoténico 16.55mg, Tiamina (B1) 0.30 mg, Piridoxina (B6) 0.31 mg, Biotina 0.08 mg, Ácido Fólico 0.75 mg.

<sup>3</sup>Cada kg de producto contiene: azufre 0.02 %, Cobalto 0.72 mg, Cobre 14.4 mg, Hierro 120 mg, Manganeseo 36 mg, Selenio 0.30 mg, Iodo 0.96 mg, Zinc 144 mg, Cloro 0.03%.

<sup>4</sup>Valor analizado (expresado en %).

<sup>5</sup>Valor calculado (expresado en Mcal/kg de ración).

inhalación de bióxido de carbono, y posteriormente se sacrificaron seccionándoles la vena Yugular (Reis de Souza *et al.*, 2005).

Los lechones sacrificados se colocaron en posición de decúbito dorsal y se procedió a incidir la región abdominal para coleccionar el páncreas, hígado; estómago e intestino delgado, los cuales se disecaron, vaciaron y pesaron. El peso de los órganos se reportó en relación al peso vivo (g/kg de PV). El páncreas se congeló en nitrógeno líquido y posteriormente se conservó a -80°C hasta la determinación de la actividad total y específica de la tripsina (Reboud *et al.*, 1962). En los contenidos del estómago, duodeno, yeyuno e íleon se determinó el pH. En los lechones sacrificados los días 3 y 16 postdestete, el intestino delgado se dividió en tres secciones (duodeno, yeyuno e íleon) como lo recomienda Makkink *et al.* (1994) y se obtuvo una muestra de 10 cm de largo de cada sección. Las porciones se lavaron con solución salina, se anudaron los extremos con hilo cáñamo y se perfundieron en formalina neutralizada al 10%

(Nabuurs *et al.*, 1993). Después de 48 h de la colecta, se procesaron los intestinos, los cuales se cortaron a cinco micrómetros de espesor, utilizando la técnica de inclusión en parafina. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron en un microscopio óptico con un aumento de 10X, efectuándose 10 mediciones por laminilla (Nabuurs *et al.*, 1993), para determinar el promedio de la altura (del ápice hasta la base) de las vellosidades y la profundidad de las criptas (de la base de la vellosidad hasta el fondo de la cripta) (Reis de Souza *et al.*, 2005).

#### Análisis estadístico

Los datos se analizaron según un modelo de bloques completos al azar, siendo el criterio de bloqueo el peso al destete, con un arreglo factorial 2 x 3 (dos tratamientos experimentales y tres días postdestete) utilizando el procedimiento de Modelos Lineales Generales (GLM) del paquete estadístico SAS (SAS, 2008). La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1980) con un nivel de significancia (P) de 0.05.

## Resultados

El peso de los lechones al momento del sacrificio, así como el peso relativo de los órganos digestivos, la actividad de la tripsina y el pH de los contenidos de

estómago, duodeno, yeyuno e íleon no fueron afectados por los tratamientos o dietas experimentales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Peso de los lechones y de los órganos digestivos, actividad de la tripsina pancreática y el pH de los contenidos digestivos según la dieta y día posdestete.

Variables	Día Posdestete			Dieta <sup>1</sup>		Probabilidad			EEM <sup>2</sup>
	0	3	16	SBT	SAT	Día	Dieta	Día* Dieta	
PS <sup>3</sup> (kg)	9.16ab	8.73b	11.44a	9.69	9.87	P<0.01	NS	NS	0.26
Peso Relativo (g/kg)									
Páncreas	1.3b	1.2b	1.79a	1.4	1.4	P<0.001	NS	NS	0.04
Estómago	4.6b	5.4b	9.4a	5.9	6.9	P<0.001	NS	NS	0.25
Higado	25	22	24	24	24	NS	NS	NS	0.47
Intestino Delgado	35a	24b	41a	34	32	P<0.001	NS	NS	1.3
Actividad de Tripsina									
Total <sup>4</sup>	3582	3368	3477	3472	3478	NS	NS	NS	34
Específica <sup>5</sup>	286b	469a	372ab	374	378	P<0.01	NS	NS	21
pH									
Estómago	3.6a	2.2b	2.8b	2.8	2.9	P<0.05	NS	NS	0.28
Duodeno	6.3ab	5.0b	6.5a	5.9	6.0	P<0.05	NS	NS	0.04
Yeyuno	6.5b	6.8a	6.5b	6.6	6.6	P<0.05	NS	NS	0.19
Ileon	6.9ab	7.4a	6.4b	6.8	7.1	P<0.05	NS	NS	0.04

<sup>1</sup>SBT: sorgo bajo en taninos; SAT: dieta con sorgo alto en taninos.<sup>2</sup>Error Estándar de la Media.<sup>3</sup>Peso al Sacrificio. <sup>4</sup>UI/g de páncreas. <sup>5</sup>UI/g de proteína pancreática.

Se observó un efecto del día posdestete sobre el PV ( $P<0.01$ ) y el peso relativo de los órganos digestivos ( $P<0.001$ ), exceptuando al hígado. El PV de los lechones en el tercer día posdestete tuvo una reducción no significativa en relación al peso al destete, con un posterior incremento significativo hasta el día 16 ( $P<0.01$ ). Los pesos relativos del páncreas y del estómago fueron similares entre el día del destete y el día 3 posdestete, incrementándose ( $P<0.001$ ) hasta el día 16. En el caso del intestino delgado, su peso relativo tuvo una importante variación ( $P<0.001$ ), observándose una reducción al día 3 posdestete y un incremento en el peso al día 16 posdestete. La actividad específica de la tripsina se incrementó ( $P<0.01$ ) en los primeros tres días posdestete y después, al día 16, se redujo a un nivel intermedio entre el valor observado al día del destete y al día 3 posdestete; la actividad total de la

tripsina no varió con la edad de los animales. El pH del contenido del estómago fue el menor de los compartimentos intestinales. El pH de los contenidos del estómago y yeyuno se modificó en el día 3 posdestete, acidificándose más en el estómago y siendo más cercana al pH neutro en el yeyuno ( $P<0.05$ ). El día 16 posdestete el pH en los contenidos de duodeno e ileon fue similar al del destete. Respecto al día 3 posdestete, al día 16 el contenido del estómago y duodeno se tornó menos ácido, mientras que el contenido del yeyuno e ileon cambió a más ácido.

La dieta y el día posdestete no afectaron la morfología de las vellosidades y criptas intestinales (Cuadro 3), excepto en el caso de las criptas de yeyuno e ileon que, independientemente de la dieta consumida, fueron más profundas ( $P<0.01$ ) en el día 16 que el día 3 después del destete.

## Discusión

El sorgo tiene un contenido de proteína cruda similar al del maíz (Reed, 1995), sin embargo su proteína es menos digestible y esto varía en función de la cantidad de taninos presentes (Fialho *et al.*, 2002; Mariscal-Landín *et al.*, 2010). A pesar de que el sorgo es el principal cereal utilizado en la alimentación de cerdos en crecimiento-finalización y reproductores en México, su uso está limitado en la alimentación de

lechones, principalmente porque los taninos afectan la digestibilidad de la proteína cruda y aminoácidos (Mariscal-Landín *et al.*, 2010). Por lo anterior, se encontraron pocas publicaciones que abordan el uso de sorgo en la alimentación de lechones recién destetados que puedan sustentar los resultados obtenidos en el presente trabajo. Los taninos son compuestos polifenólicos encontrados en varios alimentos, entre

Cuadro 3. Morfología de la mucosa intestinal según la dieta y día postdestete.

Variables <sup>1</sup>	Día Postdestete		Dieta <sup>2</sup>		Probabilidad			EEM <sup>3</sup>
	3	16	SBT	SAT	Día	Dieta	Día* Dieta	
Duodeno								
ALV	334	400	365	369	NS	NS	NS	25
PC	132	164	130	166	NS	NS	NS	12
Yeyuno								
ALV	278	312	312	278	NS	NS	NS	11
PC	116b	188a	150	154	P<0.01	NS	NS	10
Ileon								
ALV	307	312	286	333	NS	NS	NS	18
PC	122b	188a	147	164	P<0.01	NS	NS	8

<sup>1</sup>ALV: altura de las vellosidades, PC: profundidad de criptas. Valores en mm.<sup>2</sup>SBT: sorgo bajo en taninos, SAT: dieta con sorgo alto en taninos.<sup>3</sup>Error Estándar de la Media.

ellos los cereales (Serrano *et al.*, 2009). Por su estructura y reactividad hacia los agentes hidrolíticos se clasifican en dos grupos: los taninos hidrolizables y los taninos condensados (Reed, 1995; Mariscal-Landín *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2009). Los taninos hidrolizables son fácilmente digeridos por ácidos o por enzimas, además de que son más solubles en agua que los taninos condensados. Biagi *et al.* (2010) no hallaron un efecto en el PV de los cerdos por el consumo de dietas con diferentes niveles de taninos, igual que en el presente experimento. En pruebas *in vitro* los taninos inhiben fuertemente las enzimas digestivas y su efecto antinutricional se relaciona siempre con la inhibición de la digestión (Mehansho *et al.*, 1987). Sin embargo, en el presente trabajo la actividad específica de la tripsina en el tejido pancreático de los animales destetados fue mayor que en los lechones control (día cero), y no fue afectada por el nivel dietético de taninos de sorgo. Esto corrobora las aseveraciones de que en pruebas *in vivo* las enzimas digestivas no son inhibidas por los taninos dietéticos (Mitjavila *et al.*, 1977; Mole y Waterman, 1985; Mariscal-Landín *et al.*, 2004). La inhibición de la tripsina pancreática pudiera darse a nivel de la digestión intestinal, debido a la formación de un complejo enzima-tanino (Jansman *et al.*, 1994). Se ha observado *in vitro*, que en el punto isoelectrico de las proteínas, como la seroalbúmina bovina, ocurre la mayor precipitación del complejo tanino-proteína (Hagerman y Butler, 1978). Debido a que el punto isoelectrico de los tripsinógenos porcinos es de 7.5, y el pH de la digesta del duodeno de los animales del presente trabajo varió entre 5.0 y 6.5, se podría suponer que tampoco en la digesta duodenal la actividad de la tripsina fue afectada por los taninos de los sorgos incorporados, ya que a este pH no se favorece la interacción enzima-tanino. Cuando se

disminuyen los niveles de tripsina y quimotripsina intestinales, como consecuencia de la presencia de inhibidores enzimáticos, tales como los taninos, se libera un exceso de la hormona colecistoquinina, con una consecuente estimulación de la función pancreática, causando la hipertrofia del páncreas (Ahmed *et al.*, 1991). En aves se observó que debido a la reducción en la actividad enzimática, el consumo de dietas con alto contenido de taninos provocó hipertrofia pancreática, probablemente como una respuesta para compensar la inhibición en la producción de enzimas como la tripsina y la  $\alpha$ -amilasa, que son inhibidas por los taninos (Ahmed *et al.*, 1991). En las presentes condiciones experimentales el peso del páncreas no varió entre los animales alimentados con ambas dietas, lo que podría corroborar la hipótesis de que a nivel intestinal, la actividad de la tripsina no fue alterada por el consumo de las dietas con alto o bajo contenido de taninos. Mariscal-Landín *et al.* (2004), tampoco observaron un incremento del peso del páncreas en cerdos en crecimiento alimentados con niveles crecientes de taninos.

Jansman *et al.* (1994) reportaron que el uso de dietas en las que se incluyen niveles altos de taninos (provenientes de habas o su cascarrilla) reduce la ganancia de peso en cerdos, pues los taninos condensados interactúan con las proteínas dietéticas y endógenas, como las enzimas digestivas; sin embargo, en el presente trabajo no se confirmó tal observación. De la misma manera se observa que el nivel de taninos de los sorgos empleados en las dos dietas experimentales no afectó el peso de los órganos digestivos. En otros trabajos, el peso del páncreas (Jansman *et al.*, 1993) o del intestino delgado (Reis de Souza *et al.*, 2005) no varió entre los lechones que consumieron dietas SBT o SAT. Tampoco en cerdos en crecimiento alimentados con dietas a base de



sorgos con alto y bajo contenido de taninos se encontraron diferencias en el peso del páncreas (Mariscal-Landín *et al.*, 2004).

El pH de los contenidos gastrointestinales en el presente trabajo no se afectó por el nivel de taninos, coincidiendo con lo publicado por Biagi *et al.* (2010), a pesar de que hay indicios de que el consumo de sorgo alto en taninos podría alterar el balance ecológico de la flora microbiana gastrointestinal (Samanta *et al.*, 2004) y los productos de su fermentación que contribuyen al pH. Se ha observado que los taninos tienen un efecto en la selección de las enterobacterias y bacteroides (Smith y Mackie, 2004) que producen ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) en sus procesos fermentativos en lugar de ácido láctico (producido en mayor proporción por los lactobacilos y bifidobacterias) (Blank *et al.*, 2001), el cual disminuye el pH de la digesta (Pieper *et al.*, 2009). Biagi *et al.* (2010) observaron un fuerte efecto del nivel de taninos sobre la microbiota a nivel cecal.

Los cambios de los valores de pH de los contenidos gastrointestinales observados durante el periodo experimental se relacionan con el cambio de alimento entre la lactancia y la fase posdestete. El elevado pH del estómago en los animales al día del destete, probablemente fue causado por la baja capacidad de secreción de ácido clorhídrico presente en los animales jóvenes y por la elevada capacidad amortiguadora de la leche (Yen, 2001). Es probable que el bajo consumo de alimento, que normalmente se presenta en los tres primeros días posdestete, hiciera que el pH del estómago tuviera una importante reducción (Makkink *et al.*, 1994) al día 3 posdestete. El incremento del consumo de alimento sólido que ocurrió en los días posteriores pudo ser un factor que promovió el desarrollo de la mucosa gástrica (Cramwell, 1995; Reis de Souza *et al.*, 2012), repercutiendo en una mayor capacidad de secreción ácida por unidad de PV del estómago (Cramwell, 1995), reduciendo el valor del pH de la digesta respecto al destete. Sin embargo, la capacidad amortiguadora de la dieta (Levic *et al.*, 2005) es un factor que impide que el valor de pH en el estómago de los lechones sea tan bajo como el observado en los primeros días posdestete. El pH más ácido (pH = 5) observado en el contenido del duodeno en el día 3 posdestete, probablemente sea una consecuencia de la llegada del quimo ácido proveniente del estómago. Así, el pH más alcalino observado en el contenido de yeyuno e íleon al día 3 posdestete, probablemente fue una reacción esperada, debido al efecto amortiguador inicial de las secreciones pancreática y biliar seguido de la intestinal (Yen, 2001). Al día 16 posdestete el pH de los contenidos de yeyuno e íleon fueron menos

alcalinos, y se sabe que pH alcalinos en el intestino delgado pueden contribuir a un ambiente propicio para que la *E. coli* enterotoxigénica pueda colonizar las vellosidades ocasionando cuadros diarreicos; mientras que pH ácidos pueden favorecer el crecimiento de bacterias benéficas e inhiben el desarrollo de las dañinas (Williams *et al.*, 2001). La producción de ácido láctico por parte de algunas bacterias (lactobacilos) puede contribuir a mantener este pH ácido (Pieper *et al.*, 2009).

Los taninos podrían dañar la mucosa intestinal causando efectos tóxicos a nivel sistémico (Reed, 1995; Mariscal-Landín *et al.*, 2004). Sin embargo, la altura de las vellosidades intestinales de los animales alimentados con las dos dietas experimentales en el presente trabajo, muestra un comportamiento esperado para la fase posdestete (Kelly *et al.*, 1991; Vente-Spreuwerberg *et al.*, 2004ab), es decir, un acortamiento de las mismas en los tres primeros días posdestete, seguido de una recuperación de su crecimiento hasta la segunda semana posdestete. Los valores observados indican que el daño en las vellosidades de los animales de ambos tratamientos no fue afectado por el nivel de taninos. En otros trabajos, Reis de Souza *et al.* (2005) y Biagi *et al.* (2010) tampoco observaron un efecto del nivel dietético de taninos para lechones, sobre la altura de vellosidades intestinales, aunque sí hubo un efecto en la profundidad de las criptas ileales (Biagi *et al.*, 2010).

El efecto significativo de la edad de los lechones sobre las características morfofisiológicas observado en el presente trabajo, probablemente se relaciona con el incremento de la capacidad digestiva de los animales posdestete. Reis de Souza *et al.* (2012) señalaron que el consumo de alimentos sólidos es importante desde el punto de vista de la fisiología y salud gastrointestinal, pues estimula el desarrollo de la mucosa gástrica, del páncreas y del intestino delgado. A mayor consumo se observa un mayor crecimiento de la mucosa gástrica e intestinal (Cramwell, 1995), y consecuentemente de estos órganos digestivos (Reis de Souza *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2007). Sin embargo, en los dos o tres primeros días posdestete es común observar una disminución del peso de los órganos digestivos, aunque en algunos casos permanece similar al que presentaban al destete (Makkink *et al.*, 1994; Aguilera *et al.*, 2003; Pluske *et al.*, 2003; Escobar *et al.*, 2008). Esto se debe al consumo reducido de alimento en estos primeros días posdestete, provocando la atrofia de las vellosidades intestinales (Pluske *et al.*, 1997; Spreuwerberg *et al.*, 2001), con una posterior recuperación de su crecimiento. En el presente trabajo no se pudo medir la morfología de las vellosidades al momento del destete; sin embargo,

los valores reportados por Nabuurs *et al.* (1993), Hedemann *et al.* (2003) y Vente-Spreewenbergh *et al.* (2004ab) muestran que al destete las vellosidades miden entre 350 y 450  $\mu\text{m}$ , similar a lo que se observó en duodeno de los animales al día 3 (334  $\mu\text{m}$ ) y 16 (400  $\mu\text{m}$ ) posdestete. Esto indica que el nivel de taninos no tuvo un efecto en la morfología de las vellosidades y criptas intestinales. En yeyuno e ileon las vellosidades no incrementaron su altura entre el día 3 y 16 posdestete en ambos grupos de lechones.

Se concluye que el nivel de taninos del sorgo incorporado en las dietas posdestete no tuvo un efecto determinante sobre el peso de los órganos digestivos de los lechones, ni la actividad de la tripsina a nivel pancreático, el pH, ni la morfología de las vellosidades y criptas intestinales. Las características morfofisiológicas estudiadas cambiaron en el periodo posdestete, indicando una adaptación digestiva al consumo de alimento iniciador.

### Literatura Citada

- Aguilera, B. A., R. T. C. Souza, L. G. Mariscal y G. Y. Juárez. 2003. Desarrollo de los órganos digestivos hasta la cuarta semana posdestete en lechones alimentados con subproductos lácteos. XI Congreso de la AMENA y I del CLANA. Cancún, México. p. 335.
- Ahmed, A. E., R. Smtthard, and M. Ellis. 1991. Activities of enzymes of the pancreas, and the lumen and mucosa of the small intestine in growing broiler cockerels fed on tannin-containing diets. *Br. J. Nutr.* 65:189-197.
- Biagi, G., I. Cipollini, B. R. Paulicks, and F. X. Roth. 2010. Effect of tannins on growth performance and intestinal ecosystem in weaned piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 64:121-135.
- Blank, R., W. C. Sauer, R. Mosenthin, J. Zentek, S. Huang, and S. Roth. 2001. Effect of fumaric acid supplementation and dietary buffering capacity on the concentration of microbial metabolites in ileal digesta of young pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 81:345-353.
- Cramwell, P. D. 1995. Development of the neonatal gut and enzyme systems. In M. A. Varley, (Ed.). *The neonatal pig development and survival*. CAB International. Wallingford, UK. p. 99.
- Diario Oficial de la Federación: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999; 1999. Diario Oficial de la Federación, Miércoles 02 de Agosto del 2001.
- Escobar, G. K., T. C. Reis de-Souza, M. J. C. Guerrero, L. G. Mariscal, B. A. Aguilera y M. G. S. Bernal. 2008. Morfología del intestino delgado de lechones destetados alimentados con diferentes fuentes de proteína. III Congreso CLANA. Cancún, México. p. 18.
- Etuk, E. B., A. V. Ifeduba, U. E. Okata, I. Chiaka, I. C. Okoli, N. J. Okeudo, B. O. Esonu, A. B. I. Udedibie, and J. C. Moreki. 2012. Nutrient composition and feeding value of sorghum for livestock and poultry: a review. *J. Anim. Sci. Adv.* 2:510-524.
- Fialho, E. T., J. A. F. Lima, W. Oliveira, e H. O. Silva. 2002. Substituição do milho pelo sorgo sem tanino em rações de leitões: digestibilidade dos nutrientes e desempenho animal. *R. B. M. S.* 1:105-111.
- Hagerman, A. E., and L. G. Butler. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Sci. Food Agric.* 26:809-812.
- Hedemann, M. S., S. Hojsgaard, and B. B. Jensen. 2003. Small intestine morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 87:32-41.
- International guiding principles for biomedical research involving animals. 1985. The development of science-based guidelines for laboratory animal care NCBI Bookshelf. [[http://cioms.ch/publications/guidelines/1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm)]
- Jansman, A. J. M., H. Enting, M. W. A. Verstegen, and J. Huisman. 1994. Effect of condensed tannins in hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) on the activities of trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1) in digesta collected from the small intestine of pigs. *Brit. J. Nutr.* 71: 627-641.
- Jansman, A. J. M., M. W. A. Verstegen, and J. Huisman. 1993. Effects of dietary inclusion of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low and high tannin content of condensed tannins on digestion and some physiological parameters in piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 43:239-257.
- Kelly, D., J. A. Smyth, and K. J. McCracken. 1991. Digestive development in the early-weaned pig. I. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning. *Brit. J. Nutr.* 65:169-180.
- Levic, J., O. Prodanovic, and S. Sredanovic. 2005. Understanding the buffering capacity in feedstuffs. *Biotechnol. Anim. Husb.* 21:309-313.
- Makkink, C. A., P. J. M. Berntsen, B. M. L. Op-Denkamp, B. Kemp, and W. A. Verstegen. 1994. Gastric protein breakdown and pancreatic enzyme activities in response to two different dietary protein sources in newly weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 72:2843-2850.
- Mariscal-Landin, G., J. H. Avellaneda, S. T. C. Reis, B. A. Aguilera, G. A. Borbolla, and B. Mar. 2004. Effect of tannins in sorghum on amino acid ileal digestibility and on trypsin (E.C.2.4.21.4) and chymotrypsin (E.C.2.4.21.1) activity of growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 117:245-264.

- Mariscal-Landín, G., T. C. Reis de Souza, and M. A. Avalos. 2010. Ileal amino acids digestibility of sorghum in weaned piglets and growing pigs. *Anim.* 4:1341-1348.
- Mehansho, H., L. G. Butler, and D. M. Carlson. 1987. Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction, and defense mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.* 7:423-440.
- Mitjavila, S., C. Lacombe, G. Carrera, and R. Derache. 1977. Tannic acid and oxidized tannic acid on the functional state of rat intestinal epithelium. *J. Nutr.* 107:2113-2121.
- Mole, S., and P. G. Waterman. 1985. Stimulatory effects of tannins and cholic acid on tryptic hydrolysis of proteins: Ecological implications. *J. Chem. Ecol.* 11:1323-1332.
- Nabuurs, M. J. A., A. Hoogendoorn, E. J. Van-Der-Molen, and L. M. Van-Osta. 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Res. Vet. Sci.* 55:78-84.
- NRC. 1998 Nutrient requirements of swine. (10th Ed.) Washington, DC: The National Academy Press.
- Pieper, R., P. Janczyk, V. Urubschurov, U. Kornb, B. Pieper, and W. B. Souffrant. 2009. Effect of a single oral administration of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862/8866 before and at the time point of weaning on intestinal microbial communities in piglets. *Int. J. Food Microbiol.* 130:227-232.
- Pluske, J. R., D. J. Hampson, and I. H. William. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaning pig: a review. *Livest. Prod. Sci.* 51:215-236.
- Pluske, J. R., D. J. Kerton, P. D. Cranwell, R. G. Campbell, B. P. Mullan, R. H. King, G. N. Power, S. G. Pierzynowski, B. Westrom, C. Rippe, O. Peulen, and F. R. Dunshea. 2003. Age, sex, and weight at weaning influence organ weight and gastrointestinal development of weanling pigs. *Crop Pasture Sci.* 54:515-527.
- Price, M. L., S. Van Scoyoc, and L. G. Butler. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26:1214-1218.
- Reboud, J. P., A. A. Ben, et P. Desnuelle. 1962. Variations de la teneur en enzymes de pâncreas de rat en fonction de la composition des régimes. *Biochim. Biophys. Acta.* 58:326-327.
- Reed, D. J. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73:1516-1528.
- Reis de Souza, T. C., L. G. Mariscal y B. A. Aguilera. 2005. Efecto de diferentes cereales en dietas de iniciación para lechones sobre la digestibilidad de los nutrimentos y la preferencia alimentaria. *Vet. Méx.* 36:11-24.
- Reis de Souza, T. C., L. G. Mariscal, G. K. Escobar, B. A. Aguilera y B. A. Magné. 2012. Cambios nutricionales en el lechón y desarrollo morfofisiológico de su aparato digestivo. *Vet. Méx.* 43:155-173.
- Rodrigues, P. B., R. T. F. Freitas, E. T. Fialho, H. O. Silva, e T. M. Gonçalves. 2002. Digestibilidade dos nutrientes e desempenho de suínos em crescimento e terminação alimentados com rações à base de milho e sorgo suplementadas com enzimas. *R. B. M. S.* 1:91-100.
- Samanta, S., S. Giri, S. Parua, D. K. Nandi, B. R. Pati, and K. C. Mondal. 2004. Impact of tannic acid on the gastrointestinal microflora. *Microb. Ecol. Health D.* 16:32-34.
- SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT® 9.2 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Serrano, J., R. Puupponen-Pimi, A. Dauer, A. M. Aura, and F. Saura-Calixto. 2009. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 53:S310-S329.
- Smith, A. H. and R. I. Mackie. 2004. Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microb.* 70:1104-1115.
- Souza, T. C. R., M. A. B. Aguilera, A. B. Aguilera, G. L. Mariscal y M. J. C. Guerrero. 2007. Morfología del tracto digestivo de lechones alimentados con dietas con aislado o concentrado de proteínas de soya. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15:134-140.
- Spreeuwenberg, M. A. M., J. M. A. J. Verdonk, H. R. Gaskins, and M. W. A. Verstegen. 2001. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J. Nutr.* 131:1520-1527.
- Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Vente-Spreeuwenberg, M. A. M., J. M. A. J. Verdonk, G. C. M. Bakker, A. C. Beynen, and M. W. A. Verstegen. 2004a. Effect of dietary protein source on feed intake and small intestine morphology in newly weaned piglets. *Livest. Prod. Sci.* 86:169-177.
- Vente-Spreeuwenberg, M. A. M., J. M. A. J. Verdonk, J. F. J. G. Koninkx, A. C. Beynen, and M. W. A. Verstegen. 2004b. Dietary protein hydrolysates vs the intact proteins do not enhance mucosal integrity and growth performance in weaned piglets. *Livest. Prod. Sci.* 85:151-164.
- Williams, B. A., M. W. A. Verstegen, and S. Tamminga. 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutr. Res. Rev.* 14:207-227.
- Yen, J. T. 2001. Anatomy of digestive system and nutritional physiology. In: A. J. Lewis, and L. L. Southern (Eds.). *Swine Nutrition* (2nd Ed.). CRC Press LLC. Florida, USA. p 31.



## **Anexo 2**

Gómez-Soto JG; Reis de Souza TC; Mariscal-Landín G; Aguilera-Barreyro A; Bernal-Santos G; Escobar-García K. 2017. Gastrointestinal morphophysiology and presence of kafirins in ileal digesta in growing pigs fed sorghum-based diets. J Appl Anim Res. DOI asignado: 10.1080/09712119.2017.1371607.



## Gastrointestinal morphophysiology and presence of kafirins in ileal digesta in growing pigs fed sorghum-based diets

José Guadalupe Gómez Soto, Tércia Cesária Reis de Souza, Gerardo Mariscal Landín, Araceli Aguilera Barreyro, María Guadalupe Bernal Santos & Konisgmar Escobar García

To cite this article: José Guadalupe Gómez Soto, Tércia Cesária Reis de Souza, Gerardo Mariscal Landín, Araceli Aguilera Barreyro, María Guadalupe Bernal Santos & Konisgmar Escobar García (2017): Gastrointestinal morphophysiology and presence of kafirins in ileal digesta in growing pigs fed sorghum-based diets, Journal of Applied Animal Research, DOI: [10.1080/09712119.2017.1371607](https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1371607)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/09712119.2017.1371607>



© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



Published online: 06 Sep 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 119



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## Gastrointestinal morphophysiology and presence of kafirins in ileal digesta in growing pigs fed sorghum-based diets

José Guadalupe Gómez Soto<sup>a</sup>, Tércia Cesária Reis de Souza<sup>a</sup>, Gerardo Mariscal Landín<sup>a,b</sup>, Araceli Aguilera Barreyro<sup>a</sup>, María Guadalupe Bernal Santos<sup>a</sup> and Konisgmar Escobar García<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México; <sup>b</sup>CENID-Fisiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colón, Querétaro, México

### ABSTRACT

We evaluated the effects of three sorghum-based diets with different levels of tannins and kafirins on some gastrointestinal morphophysiological characteristics of growing pigs. We also evaluated the pigs' performance and the presence of kafirin fractions in sorghum samples and in ileal digesta. We used 24 pigs that weighed  $22.1 \pm 0.65$  kg randomly assigned to four different cereal-soybean meal diets: a corn-based (control diet; C), a low tannin and low kafirin sorghum-based (LTLK), a low tannin and high kafirin sorghum-based (LTHK), and a high tannin and high kafirin sorghum-based (HTHK). We evaluated the pH of the gastrointestinal digesta, the liver and pancreas weight, and the total and specific trypsin and chymotrypsin enzymatic activities in the pancreas, and the intestinal villi morphology. The results indicated that the different sorghum diets did not affect the performance of the pigs ( $P > .05$ ) or the majority of the evaluated morphophysiological parameters. The total trypsin activity was higher in pigs fed the HTHK diet ( $P < .001$ ). The highest intensity/area of the kafirin fractions was noted in ileal digesta from pigs fed LTHK and HTHK diets. The simultaneous presence of high levels of tannins and kafirins could affect the digestion of sorghum proteins.

### ARTICLE HISTORY

Received 21 July 2016  
Accepted 17 August 2017

### KEYWORDS

Sorghum; tannins; kafirin fractions; pigs; electrophoresis; western blot

## 1. Introduction

During the last few years, sorghum has been the fifth most economically important grain in the world, after wheat, corn, rice and barley (Monk et al. 2014). It is considered a primary feed crop in the semiarid tropical regions of Asia, Africa and South America, because it is cultivated in dry areas with low soil moisture (Rakshit et al. 2014; Mateus et al. 2016). In Mexico, sorghum is the second most produced cereal after corn and is almost exclusively used in animal feeds (Mariscal-Landín et al. 2004) mainly in pig nutrition. Sorghum and corn have similar crude protein content, but the nutritional value of sorghum may be lower due to the presence of tannins (Fialho et al. 2002) and kafirins (Aboubacar et al. 2001; Chiquito-Almanza et al. 2011). Tannin content in sorghum grains can vary considerably among different genetic backgrounds (Wu et al. 2012), and their hybrid can be divided into high and low tannin (Mariscal-Landín et al. 2004). Sorghums with low tannin content are the most commonly cultivated sorghums in Mexico and in the world (Oria et al. 2000; Ramirez et al. 2005), despite the fact that the sorghum hybrids with high tannins have added protection from birds and fungal infestations (Wu et al. 2012). Tannins are polyphenolic compounds of high molecular weight that are present in the pericarp of the grain (Mueller-Harvey 2006). Tannins are classified as either hydrolysable or condensed (Lee et al. 2010; Van Parys et al. 2010), and there are the condensed tannins that are present in sorghum (Fayyaz and Naser 2015). Tannins

form complexes with polysaccharides and proteins (dietary and endogenous), and bind to digestive enzymes, amino acids, fatty acids and nucleic acids (Serrano et al. 2009; Jezierny et al. 2011; Piluzza et al. 2014), which may affect digestive secretions and nutrients use.

Kafirins are the most abundant proteins in sorghum (De Mesa-Stonestreet et al. 2010). Based on differences in solubility, molecular weight, structure, and amino acid composition (Bansal et al. 2008), the kafirins are classified into  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  fractions. To separate these fractions many researchers have used electrophoresis test (Hamaker et al. 1995; El Nour et al. 1998; Duodu et al. 2002; Nunes et al. 2005). However, western blot test can also be employed using specific anti-kafirin antibodies (Mazhar and Chandrashekar 1995; Wong et al. 2010).

Kafirins can affect sorghum nutrient utilization (Kumar et al. 2012) because they are non-soluble in water (Xiao et al. 2015), and contain high levels of proline, an amino acid that has a high affinity to form complexes and bind to tannins (Taylor et al. 2007; Piluzza et al. 2014), which further limits the action of the digestive enzymes on dietary proteins. Kafirins are also the last proteins to be digested in sorghum flour (Hamaker et al. 1986), which is probably because they are encapsulated in protein bodies in the endosperm of the grain (Chandrashekar and Mazhar 1999; Bansal et al. 2008) and they form polymers, trimers and dimers (Nunes et al. 2005; Belton et al. 2006) affecting the digestive process.

**CONTACT** Tércia Cesária Reis de Souza  tercia@uaq.mx

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



Because tannins and kafirins in sorghum may affect enzyme activity, and consequently the digestion and absorption of nutrients that would be used for the development of the pig, our hypothesis was that high tannin and high kafirin sorghum-based diets fed to pigs could decrease pigs' performance. The objective of this study was to investigate the effect of different sorghum-based diets, with different levels of tannins and kafirins, on some morphophysiological characteristics of the digestive tract in growing pigs (pH of gastrointestinal content, weight of liver and pancreas, enzymatic activity of trypsin and chymotrypsin, and morphology of the intestinal mucosa). We also evaluated kafirin profiles in samples of sorghums and ileal digesta samples using two different tests (electrophoresis and western blot).

## 2. Materials and methods

The experiment was performed at the National Center of Disciplinary-Research Physiology of the National Institute of Forestry, Crops and Livestock (INIFAP) in Mexico. The protocol was reviewed and approved by the Autonomous University of Queretaro's Natural Science Faculty's Bioethics Committee (authorization: 90-FCN-2014). The management of the experimental animals was performed according to the Mexican Official Norm 'NOM-062-ZOO-1999' guidelines (Diario Oficial de la Federación 2001) and the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS/ICLAS 2012). The laboratory analyses were performed at the Natural Science Faculty's Animal Nutrition Laboratory.

### 2.1. Experimental treatments

The chemical composition of the three sorghum hybrids and the corn used in the experiment were determined before formulating the diets. The content of prolamins (true kafirins in sorghum and true zeins in corn, which are homologous proteins, according to Oom et al. 2008) were determined (Hamaker et al. 1995), as well as the condensed tannin content of the sorghum hybrids (Price et al. 1978). Then we classified the three sorghums hybrids into low in tannins and low in kafirins (LTLK), low in tannins and high in kafirins (LTHK), and high in tannins and high in kafirins (HTHK) (Table 1). The gross energy of the sorghum and corn were quantified using calorimetry (Bateman 1970). Crude protein, ashes, and ether extract were also determined, based on the AOAC (2002) methods 976.05, 923.03, and 920.35, respectively. Neutral detergent fibre was also quantified (van Soest et al. 1991). Amino acid determination was performed according to the 994.12 method of AOAC (2002), which involved samples being hydrolysed at 110°C for 24 h in HCl 6M. Amino acid quantification was performed using ion exchange, applying the post-column derivatization test in a HPLC (Model 1100 HPLC, Hewlett Packard®), attached to a Pickering Pinnacle PCX. To determine methionine and cysteine content, a previous oxidation with performic acid was performed (Csapó et al. 2005).

Based on the results of chemical analysis of the major ingredients, four different cereal-soybean meal diets were formulated: a corn-based diet (control diet; C), an LTLK sorghum-

**Table 1.** Chemical composition of the sorghum hybrids and corn as fed.

	Sorghum hybrids			Corn
	LTLK	LTHK	HTHK	
Dry material (DM)	89.16	89.06	87.86	88.31
Crude protein, %	8.02	9.10	7.45	7.74
True kafirins <sup>a</sup>	58.69	73.64	69.53	–
True zeins <sup>a</sup>	–	–	–	56.80
Tannins, %	ND	ND	5.40	ND
Gross energy, Mcal/kg	3981	3940	3999	4045
Ashes, %	1.50	2.50	1.90	1.10
Neutral detergent fibre, %	10.24	8.49	8.71	6.55
Ether extract, %	2.19	2.62	2.45	3.65
Amino acids (g/kg of DM)				
Alanine	0.63	0.79	0.56	0.51
Arginine	0.30	0.34	0.28	0.36
Aspartic acid	0.22	0.60	0.45	0.44
Cysteine	0.17	0.14	0.14	0.17
Glutamic acid	1.44	1.79	1.27	1.23
Glycine	0.21	0.24	0.20	0.26
Histidine	0.19	0.21	0.17	0.24
Isoleucine	0.33	0.38	0.29	0.27
Leucine	1.04	1.25	0.87	0.86
Lysine	0.26	0.28	0.25	0.32
Methionine	0.17	0.16	0.14	0.20
Proline	0.72	0.44	0.41	0.49
Phenylalanine	0.43	0.50	0.37	0.37
Serine	0.22	0.34	0.27	0.31
Threonine	0.16	0.29	0.23	0.26
Tyrosine	0.29	0.34	0.26	0.26
Valine	0.40	0.47	0.35	0.37

<sup>a</sup>In the case of corn are true prolamins or true zeins. Expressed as the percentage content of prolamins regarding the content of crude protein.

ND: None detected.

based diet, an LTHK sorghum-based diet, and an HTHK sorghum-based diet (Table 2). All diets were formulated using the ideal protein concept, according to the digestible amino acid requirements recommended by the NRC (2012). To formulate the HTHK diet, a lower amino acid digestibility of the high tannin sorghum was considered (Mariscal-Landin et al. 2004),

**Table 2.** Composition of experimental diets as fed.

Ingredients (% of total)	Diets			
	LTLK	LTHK	HTHK	C
Sorghum	68.69	72.13	69.09	–
Corn	–	–	–	68.51
Soybean meal	25.75	22.45	25.45	25.86
Soybean oil	2.14	1.86	1.92	2.28
L-Lysine	0.41	0.49	0.45	0.40
L-Threonine	0.10	0.11	0.13	0.09
DL-Methionine	0.14	0.14	0.17	0.10
L-Tryptophan	–	0.01	0.01	0.01
Common salt	0.50	0.50	0.50	0.50
Calcium carbonate	0.74	0.75	0.74	0.73
Dicalcium phosphate	1.19	1.22	1.20	1.18
Vitamins <sup>a</sup>	0.24	0.24	0.24	0.24
Minerals <sup>b</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10
Chemical composition				
Dry Matter, %	91.94	91.99	92.35	92.64
Crude protein, %	17.62	15.88	16.69	16.80
Ashes, %	5.87	7.24	5.11	4.57
Metabolizable energy, Mcal/kg	3.30	3.30	3.30	3.30
Gross energy, Mcal/kg	4.23	4.34	4.33	4.39

<sup>a</sup>Each kg of product contains vitamin A 10,200 international units (IU), vitamin D 1.98 IU, vitamin E 0.06 IU, vitamin K 1.20 mg, riboflavin (B2) 7.20 mg, vitamin B12 (cyanocobalamin) 0.04 mg, choline 968.58 mg, niacin 36 mg, pantothenic acid 16.55 mg, thiamin (B1) 0.30 mg, pyridoxine (B6) 0.31 mg, biotin 0.08 mg, and folic acid 0.75 mg.

<sup>b</sup>Each kg of product contains sulphur 200 mg, cobalt 0.72 mg, copper 14.4 mg, iron 120 mg, manganese 36 mg, selenium 0.30 mg, iodine 0.96 mg, zinc 144 mg, and chloride 300 mg.



which favoured the inclusion of more digestible amino acids from soybean meal and the addition of crystalline amino acids. Dry matter, crude protein, ashes (AOAC 2002), and gross energy (Bateman 1970) of the diets were analysed (Table 2).

## 2.2. Animals

Twenty-four growing pigs (Fertilis 20x G Performance, Genetiporc®) of both sexes, with an average body weight (BW) of  $22.1 \pm 0.65$  kg were used. The experiment was performed in two blocks (different months) with 12 pigs in each one, and a total of 6 animals being assigned to one of the four diets. The pigs were housed for 12 d in individual pens (elevated 50 cm), equipped with an individual feeder and a nipple drinker. Pigs had *ad libitum* access to their diet and water during the entire experiment. Average daily feed intake (ADFI) and average daily gain (ADG) were recorded, and the gain to feed ratio (G:F) was calculated.

## 2.3. Sampling

At the day 12 of the experiment, the pigs were weighed and tranquillized with azaperone (2 mg/kg BW). They were then anaesthetized with isoflurane (inhaled) and slaughtered using a cardiac overdose of sodium pentobarbital (50 mg/kg BW). An incision was done in the abdomen midline, and the pancreas and liver were collected and weighed. The pancreas was maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the total and specific activities of trypsin (Reboud et al. 1962) and chymotrypsin (Bergmeyer et al. 1974) were measured. Protein concentration in the pancreatic tissue was quantified as described by Lowry et al. (1951). The stomach, jejunum, ileum, caecum, and colon were dissected and emptied, and the pH of their content was measured using a potentiometer (Model PH211, Hanna Instruments®). The ileal digesta from the pigs on the sorghum-based diets were collected to perform the electrophoresis and western blot tests. They were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ , until they were lyophilized and grounded using a mill with 1 mm sieve (Thomas-Wiley®), and the crude protein (AOAC 2002) was determined.

In order to measure the villi height and crypts depth, 10 cm sections of the duodenum, jejunum, ileum, and caecum were collected, washed with a saline solution, and preserved in a 10% neutral formalin solution. Afterwards, the sections were fixed in paraffin, sectioned into 5  $\mu\text{m}$  slices, stained with haematoxylin and eosin, and inspected using an optical microscope (Vert. A1, Zeiss®). Ten villi and crypts of each intestinal section were measured (Nabuurs et al. 1993) using AxioVision 4.9 software (Zeiss®).

## 2.4. Electrophoresis and western blot tests

A total of six 12% polyacrylamide gels (SDS-PAGE) were used for the identification and analyses the profiles of kafirins in the three sorghums and in the ileal digesta from four pigs of each diet (Laemmli 1970). Four of these gels were used for the electrophoresis tests and two for western blot tests. The sorghums and ileal digesta samples (50  $\mu\text{g}$  of crude protein), under

reducing conditions (Duodu et al. 2002), were placed in the wells of each gel. Gels for the electrophoresis tests were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Xiao et al. 2015). In three wells of each electrophoresis gel, 3, 6, and 12  $\mu\text{g}$  of bovine serum albumin were placed as a known concentration of internal standard protein to make the standard curve (Sato et al. 1986) to quantify the amount of monomeric kafirin fractions in the ileal digesta.

To perform the western blot tests, all bands were transferred to nitrocellulose membranes (Cat. 162-0115, Bio-Rad), and blocked with a 5% concentration of skimmed milk (Le Gall et al. 2005). After being blocked, the membranes were incubated with polyclonal antibodies (produced by rabbits) that acted against the sorghum kafirins. In order to produce the anti-kafirin antibodies, three rabbits were each inoculated three times in the back (intradermally), with an interval of 15 d between inoculations. For the first inoculation, the rabbits received 0.5 mg of emulsified kafirins in complete Freund's adjuvant (Cat. F5881, Sigma). For the other inoculations, the rabbits received 0.25 mg of emulsified kafirins in an incomplete Freund's adjuvant (Cat. F5506, Sigma). Seven days after the last inoculation, the rabbits were slaughtered, and plasma samples were obtained from each one (Stills 2012). The anti-kafirin antibodies were used in a 1:600 dilution. A commercial anti-rabbit IgG produced in donkeys was used as a second antibody (A120-208P, Bethyl Lab.) in a 1:2000 dilution. The dilutions of antibodies were established using a dot blot test (Hawkes et al. 1982). Finally, the western blot was revealed with a peroxidase substrate kit (SK-4800, Vector Lab).

The gels of electrophoresis and the nitrocellulose membranes were digitalized using a Molecular Imager Gel Doc XR System (Universal Hood II, Bio-Rad) and analysed using the Quantity One V 4.6.7 software (Bio-Rad). The amount of protein of each monomeric kafirin band was expressed as ng/ $\mu\text{g}$  of ileal digesta protein in electrophoresis, and as intensity/area in western blot (Wong et al. 2009; Elkonin et al. 2013).

## 2.5. Statistical analysis

Data were analysed as a randomized complete block design, and measures were compared using Tukey's test (Steel and Torrie 1980) with the GLM procedure of SAS (2008). Statistical differences were considered significant at  $P < .05$ .

## 3. Results

### 3.1. Chemical composition

The chemical composition of the sorghum hybrids and corn are shown in Table 1. The three sorghum hybrids were classified as low (undetectable) in tannins and low (58.6%) in kafirins (LTLK), low (undetectable) in tannins and high (73.6%) in kafirins (LTHK), and high (5.4%) in tannins and high (69.5%) in kafirins (HTHK). The true zein content of the corn was similar to the true kafirin content of the LTLK sorghum hybrid. We observed some differences between the sorghum hybrids for crude protein, neutral detergent fibre, and ether extract content. However, gross energy content was similar. There were some differences in composition between the corn and sorghum



hybrids, mainly for the neutral detergent fibre and ether extract content, as well as for the amino acids profile.

### 3.2. Performance and morphophysiological characteristics

There was no effect of diet on pig performance ( $P > .05$ ). The average values observed in all pigs were an ADFI of 1.568 kg and an ADG of 0.685 kg, with a G:F ratio of 0.448.

Table 3 shows that the experimental diets also did not affect ( $P > .05$ ) the pH of the digesta in the stomach and intestinal portions, the liver and pancreas relative weights, the specific trypsin activity, the total and specific activities of chymotrypsin, the villi height, and crypt depth in all intestinal portions. However, pigs fed the HTHK diet had a higher total trypsin activity (TTA;  $P = .003$ ).

### 3.3. Identification of kafirins

Figure 1 shows an electrophoresis gel that is representative of the four analysed gels. We detected the kafirin fractions  $\gamma$  (27.9 kDa),  $\alpha_1$  (25.4 kDa),  $\alpha_2$  (24 kDa), and  $\beta$  (18.9 kDa) in the sorghum samples. In the ileal digesta samples, the kafirin fractions  $\gamma$ ,  $\alpha_1$ , and  $\alpha_2$  were still present, whereas the  $\beta$  fraction was no longer present.

Table 4 shows the analysis of the kafirin bands present in the electrophoresis gels. The  $\alpha_1$  kafirins had more ( $P \leq .01$ )

concentration in the ileal digesta from the pigs fed HTHK diet than in the pigs fed the low tannin diets (LTLK and LTHK). The concentration of the  $\alpha_2$  and  $\gamma$  kafirin fractions was not affected ( $P > .05$ ) by the diets.

Figure 2 shows a western blot representative of the two analysed in the study. We detected dimers and trimers with a molecular weight of 61–81 kDa, as well as the kafirin fractions  $\gamma$  (27.5 kDa),  $\alpha_1$  (25.5 kDa),  $\alpha_2$  (23.1 kDa), and  $\beta$  (18.9 kDa), in the sorghum samples and in the ileal digesta. The intensity/area of kafirin polymers was considerably lower in the ileal digesta than in the sorghum samples. Also we detected in the ileal digesta some residues of kafirin digestion with a very low molecular weight, regardless of the diet.

Table 4 also shows the analysis of the kafirin bands present in the western blot tests. In addition, for the  $\gamma$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  and  $\beta$  kafirin fractions, a higher intensity/area was noted for the high kafirin diets (LTHK and HTHK) than for the LTLK diet ( $P < 0.05$ ).

## 4. Discussion

The variation in the chemical composition of the sorghum hybrids (Mariscal-Landín et al. 2004; Ramírez et al. 2005) indicates an essential need for the feed industry to perform more frequent analyses of their ingredients. Regarding the crude protein level, there was a lower variation (7.4%–9.1%) in values for the sorghums used in this study than for the sorghums mentioned in the literature (6.6–15%; Ramírez et al. 2005). The crude protein level of the LTHK sorghum and the corn used in the present study were in accordance with the NRC (2012), while the crude protein levels of the LTLK and HTHK sorghums were in accordance with Rostagno et al. (2011).

There was also considerable variation in the levels of tannins for the three sorghum hybrids used in this study. In two of the hybrids, no tannins were detected, whereas the third hybrid had a high (5.4%) level of tannins, similar to the values for typical high tannin varieties (Ramírez et al. 2005; Gómez-Soto et al. 2015).

The values of kafirins observed in this study varied between 58.6% and 73.6%. These data were within the range (37.5% and 72.9%) reported by Selle et al. (2010). A high proportion of sorghum proteins are kafirins (Wong et al. 2009), and therefore an increase in total crude protein is likely related to an increase of kafirins (Mossé et al. 1988), as we observed for the low tannin sorghums.

Our results suggest that low tannin sorghums can replace corn in the diets of pigs between 10 and 30 kg without negatively affecting ADFI, ADG, and the feed conversion ratio (Fialho et al. 2004). We also observed that, when diets are formulated based on the digestible amino acid content, it is possible to use high tannin sorghums without affecting the growth of animals.

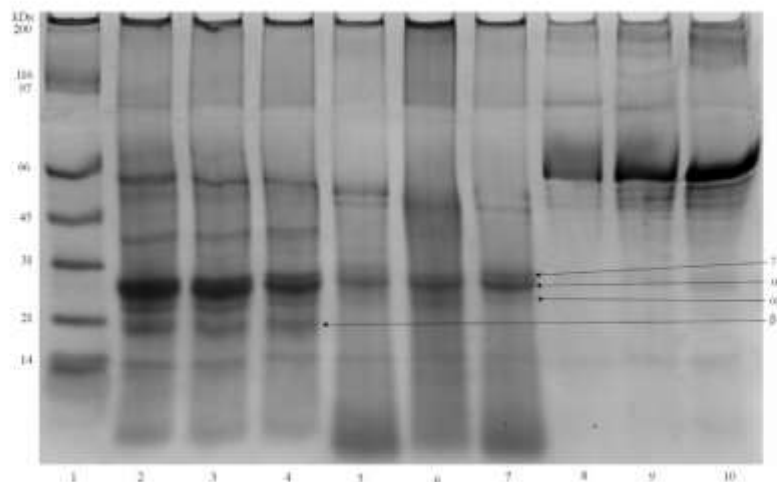
One of the hypotheses of this study was that high tannin and kafirin levels in sorghum would have a negative effect on the growth of animals and the morphophysiology of the intestinal tract. This is because many authors have noted that tannins form complexes with digestive enzymes (Jansman et al. 1993; Emmambux and Taylor 2003), polysaccharides, and proteins (Duodu et al. 2002; Serrano et al. 2009), which may affect

**Table 3.** Morphophysiological characteristics of the digestive tract of pigs fed different sorghum- and corn-based diets.

	Diets				P	SEM
	LTLK	LTHK	HTHK	C		
pH						
Stomach	3.5	2.7	3.7	3.7	.136	0.14
Jejunum	6.5	6.4	5.8	5.8	.144	0.16
Ileum	6.5	6.3	5.4	5.4	.092	0.15
Caecum	5.6	5.7	5.5	5.5	.565	0.05
Colon	5.7	5.6	5.6	5.6	.933	0.05
RW (g/kg BW)						
Liver	29.5	30.3	28.3	30.4	.482	0.50
Pancreas	2.3	2.3	2.3	2.1	.462	0.05
Enzymatic activity						
TTA	3532 <sup>a</sup>	3430 <sup>a</sup>	4069 <sup>b</sup>	3402 <sup>a</sup>	.003	60.0
STA	50	47	57	47	.146	1.7
TCA ( $\times 10^3$ )	225	200	237	242	.184	6.9
SCA	3728	2884	2662	3368	.114	105.0
Duodenum						
VH ( $\mu$ m)	436	489	467	467	.290	12.2
CD ( $\mu$ m)	206	200	214	214	.554	6.9
Jejunum						
VH ( $\mu$ m)	469	433	453	453	.216	14.0
CD ( $\mu$ m)	222	211	204	204	.225	8.3
Ileum						
VH ( $\mu$ m)	462	460	471	471	.789	16.3
CD ( $\mu$ m)	217	213	226	226	.945	8.4
Caecum						
CD ( $\mu$ m)	493	537	495	495	.511	10.7
Colon						
CD ( $\mu$ m)	448	498	492	492	.614	15.9

Note: Values in the same row without a common superscript letter are significantly different ( $P < .05$ ).

SEM: standard error of the mean; RW: relative weight; TTA: total trypsin activity, as International Units (IU)/g of pancreas; STA: specific trypsin activity, as IU/mg of pancreatic protein; TCA: total chymotrypsin activity, as IU/g of pancreas; SCA: specific chymotrypsin activity, as IU/mg of pancreatic protein; VH: villi height; CD: crypts depth.



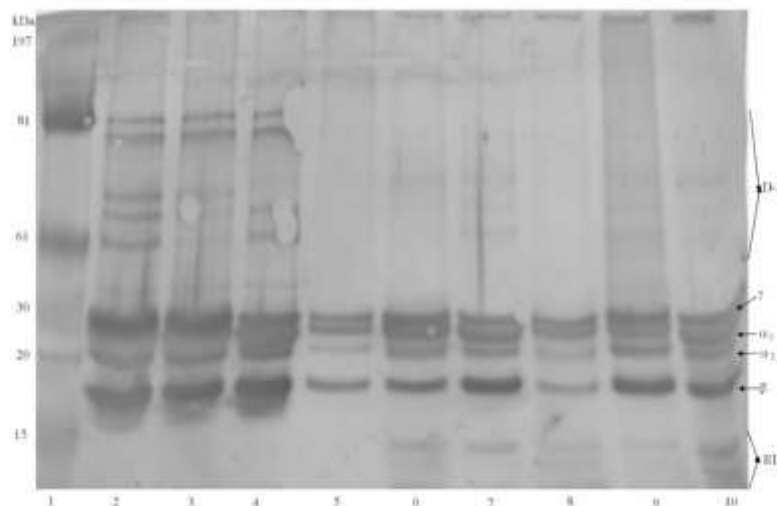
**Figure 1.** Electrophoresis gel indicating the presence of kafirin fractions in sorghum grains and non-digested kafirin fractions in the ileal digesta of pigs fed different sorghum-based diets. 1: molecular weight (Cat. 161-0317, Bio-Rad); 2: sorghum LTLK; 3: sorghum LTHK; 4: sorghum HTHK; 5: ileal digesta diet LTLK; 6: ileal digesta diet LTHK; 7: ileal digesta diet HTHK; 8–10: bovine serum albumin (known molecular weight of 66 kDa).

**Table 4.** Concentrations of monomeric kafirin bands detected by electrophoresis and western blot tests.

Kafirin fraction	Sorghum-based diets			P	SEM
	LTLK	LTHK	HTHK		
Electrophoresis (ng/ $\mu$ g of ileal digesta protein)					
Gamma ( $\gamma$ )	28.1	28.0	33.8	.340	3.3
Alfa 1 ( $\alpha_1$ )	147.8 <sup>b</sup>	128.4 <sup>b</sup>	181.5 <sup>a</sup>	.002	4.3
Alfa 2 ( $\alpha_2$ )	38.2	39.8	38.9	.983	3.3
Western blot (intensity/area)					
Gamma ( $\gamma$ )	5056 <sup>b</sup>	6121 <sup>a</sup>	6167 <sup>a</sup>	.003	102.3
Alfa 1 ( $\alpha_1$ )	5367 <sup>b</sup>	6402 <sup>a</sup>	6098 <sup>a</sup>	.009	105.9
Alfa 2 ( $\alpha_2$ )	3454 <sup>b</sup>	5331 <sup>a</sup>	5746 <sup>a</sup>	.003	199.9
Beta ( $\beta$ )	6262 <sup>b</sup>	10807 <sup>a</sup>	13412 <sup>a</sup>	.004	633.3

Note: Values in the same row without a common superscript letter are significantly different ( $P < .05$ ).  
SEM, standard error of the mean.

digestion and absorption of the nutrients. Furthermore, the complexes formed between the proline of kafirins and tannins reduce the possibility of enzymatic action over the proteins (Emmambux and Taylor 2003) and decrease the digestibility of most of the essential amino acids (Jansman et al. 1993). This occurs mainly in the high tannin sorghums (>4%) (Mariscal-Landin et al. 2004, 2010). Thus, with a lower digestive utilization of sorghum proteins, we expected to observe a negative effect of high kafirin diets (LTHK and HTHK) on the parameters evaluated for the pigs. However, our results showed no negative effects on performance nor on the morphophysiological characteristics of the digestive tract, corroborating with the results of Mariscal-Landin et al. (2004) who reported that the



**Figure 2.** Western blot indicating the presence of kafirin fractions in sorghum grains and non-digested kafirin fractions in the ileal digesta of pigs fed different sorghum-based diets. D-T: dimers and trimers of kafirins; RD: digestion residues of kafirins; 1: molecular weight (Cat. 161-0324, Bio-Rad); 2: sorghum LTLK; 3: sorghum LTHK; 4: sorghum HTHK; 5 and 8: ileal digesta diet LTLK; 6 and 9: ileal digesta diet LTHK; 7 and 10: ileal digesta diet HTHK.



tannin content did not affect pancreas weight and specific activity of trypsin.

Our findings showed that TTA in pancreatic tissue increased in response to the HTHK diet, whereas Jansman et al. (1994) reported that animals fed high tannin sorghums have a reduction in trypsin activity in their ileal content. The increase in pancreatic trypsin activity is probably due to the interaction between tannins and trypsin in the intestine, decreasing the amount of trypsin available for hydrolysis and increasing the amount of cholecystokinin secreted which stimulate the pancreatic secretion (Fushiki and Iwai 1989; Ahmed et al. 1991; Thaela et al. 1995) and, in turn, the trypsin secretion.

The weight of the pigs is an important factor that needs to be considered, because we used growing pigs that had a functional and mature gastrointestinal tract (Mariscal-Landín et al. 2010), which allows them to take advantage of the nutrients of the food in a better way, and when the pigs have up to 25 kg BW, the presence of tannins showed little effect on growth performance (Lizardo et al. 1995). In fact, the pigs weighed  $22.1 \pm 0.65$  kg at the start of the experiment and they weighed  $30.5 \pm 1.36$  kg at the end of the experiment. So two factors could explain the absence of an adverse effect of tannins on pigs' performance. The first was that diets were formulated to furnish the same amount of digestible amino acids, diminishing the deleterious tannin effect on amino acids digestibility (Selle et al. 2010). The second factor was the pig weight (22–30 kg) because they were able to maintain the same feed intake avoiding the main adverse effect of tannins (reduction of feed intake) on performance (Lizardo et al. 1995).

The fact that we found the kafirin fractions in the ileal digesta confirmed the effect of tannins and kafirins on the digestibility of sorghum-based diets observed by Mariscal-Landín et al. (2004). Regarding the electrophoresis test, the HTHK diet resulted in a higher concentration of  $\alpha_1$  kafirins, which indicates a lower digestibility (Aboubacar et al. 2001) of this fraction compared to the  $\alpha_1$  kafirins in the other diets. Several authors reported that  $\alpha$  kafirins are located in the central and internal part of the protein body of sorghum, while  $\gamma$  kafirins (Nunes et al. 2005; De Mesa-Stonestreet et al. 2010) and  $\beta$  kafirins are located in the peripheral area of the grain (Taylor et al. 2007). Because of the location of the  $\alpha$  kafirins, the digestive enzymes probably have difficulty to hydrolyse these kafirins, whereas the  $\beta$  and  $\gamma$  kafirins are the first fractions to be degraded, owing to their peripheral location (Oria et al. 1995, 2000). This may be the reason for the larger quantity of  $\alpha_1$  kafirins in the ileal digesta, especially for the pigs fed the HTHK diets.

In the ileal digesta,  $\beta$  kafirins were not detected by electrophoresis, and this suggests that they were totally digested. However, two factors need to be considered. First,  $\beta$  kafirins represent only 8–13% of the kafirins present in sorghum grain, while  $\alpha$  kafirins represent 66–84% (Chamba et al. 2005; Wong et al. 2009; De Mesa-Stonestreet et al. 2010). Second, Coomassie blue staining has a limited capacity to detect proteins (Westmeier 2011).

In the western blot test, all kafirin fractions were detected in the ileal digesta, even  $\beta$  and the low-molecular-weight kafirins, due to the high specificity of this test (Sambrook and Russell 2001) because specific antibodies against sorghum kafirins were used. The presence of  $\beta$  kafirins in the western blot test

and the higher concentration observed in the ileal digesta for pigs fed high kafirin diets (LTHK and HTHK) indicate that  $\beta$  kafirins were not totally digested, and their digestibility is probably related to the kafirin level in the sorghum.

The  $\gamma$  kafirin fractions were present in the ileal digesta in the electrophoresis and western blot tests (Figures 1 and 2). The  $\gamma$  kafirin fractions are rich in cysteine and proline (Oria et al. 2000; Duodu et al. 2003; Belton et al. 2006) and have an inherent capacity to form disulphide bonds and protease-resistant complexes (Chandrashekar and Mazhar 1999; Wong et al. 2010). Pigs fed high kafirin diets (LTHK and HTHK) had a large concentration of the  $\gamma$  kafirin fraction, indicating that this fraction is poorly digested, because a higher intensity/area in ileal digesta indicates a lower digestibility of the proteins (Aboubacar et al. 2001; Wong et al. 2009).

The presence of kafirins in trimers and dimers or in a monomeric state in the ileal digesta suggests that kafirins are also resistant to enzymatic digestion, regardless of their position in the protein body in the grain, and this is probably due to their hydrophobic nature (Hamaker et al. 1986, 1987; Xiao et al. 2015). The low-molecular-weight kafirin bands detected in the ileal digesta were not found in the sorghum samples, which suggests that they are not the  $\delta$  kafirins described by Belton et al. (2006) and De Mesa-Stonestreet et al. (2010), and are probably peptides of kafirins partially digested.

The effect of the intake of an elevated kafirin level in the ileal digesta is demonstrated in the western blot test, by a higher quantity in the  $\gamma$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , and  $\beta$  kafirin fraction bands in pigs fed the high kafirin diets independently of the tannin levels (LTHK and HTHK), corroborating that not only tannin levels are a factor to consider when pigs fed diets with sorghum but also that kafirin levels must be considered (Elkin et al. 1996; Mariscal-Landín et al. 2010), as they could negatively affect the digestibility of the sorghum protein.

## 5. Conclusion

There was no adverse effect of the sorghum tannins and kafirins on the performance of the growing pigs and in most of the morphophysiological characteristics of their gastrointestinal tract. Western blot was more sensible and specific than electrophoresis to detect kafirin fractions. The raised concentration of kafirins detected by western blot test in the ileal digesta of pigs fed LTHK and HTHK diets suggests that kafirins negatively affect the digestibility of dietary protein. Thus, not only tannin but also kafirin content in sorghums fed by pigs affected the digestion of dietary proteins.

## Disclosure statement

No potential conflict of interests was reported by the authors.

## Funding

This work was supported by National Institute of Forestry, Crops and Livestock (INIFAP) [Grant Number SIGI, number 1317362189], Educational Quality Enhancement Program [Grant Number PFCE-2016] and Autonomous University of Queretaro.



## References

- Aboubacar A, Axtell JD, Huang C-P, Hamaker BR. 2001. A rapid protein digestibility assay for identifying highly digestible sorghum lines. *Cereal Chem*. 78:160–165.
- Ahmed AE, Smithard R, Ellis M. 1991. Activities of enzymes of the pancreas, and the lumen and mucosa of the small intestine in growing broilers cockerels fed on tannin-containing diets. *Br J Nutr*. 65:189–197.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2002. Official methods of analysis, 17th ed. Arlington (VA): Association of Official Analytical Chemists.
- Bansal S, Mishra A, Tomar A, Sharma S, Khanna VK, Garg GK. 2008. Isolation and temporal endosperm expression of  $\gamma$ -kafirin gene of grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) var. M 35-1 for introgression analysis of transgene. *J Cereal Sci*. 48:808–815.
- Bateman JV. 1970. Nutrición animal: manual de métodos analíticos (Animal nutrition: manual of analytical methods). México: Herrero Hermanos, Sucesores, S.A.
- Belton PS, Delgadillo I, Halford NG, Shewry PR. 2006. Kafirin structure and functionality. *J Cereal Sci*. 44:272–286.
- Bergmeyer HU. 1974. Methods of enzymatic analysis, 3rd. ed. New York (NY): Academy Press.
- Chamba EB, Halford NG, Forsyth J, Wilkinson M, Shewry PR. 2005. Molecular cloning of  $\beta$ -kafirin, a methionine-rich protein of sorghum grain. *J Cereal Sci*. 41:381–383.
- Chandrashekar A, Mazhar H. 1999. The biochemical basis and implications of grain strength in sorghum and maize. *J Cereal Sci*. 30:193–207.
- Chiquito-Almanza E, Cobielle-Castreón G, Montes-García N, Pecina-Quintero V, Anaya-López JL. 2011. Kafirins, key proteins to improve digestibility and proteic quality of sorghum grain. *Rev Mex Cienc Agr*. 2:235–248.
- [CIOMS/ICLAS] Council for the International Organization of Medical Sciences and International Council for Laboratory Animal Science. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. 2012. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals [Internet]. CIOMS/ICLAS. [accessed 2013 Jan 15]. <http://www.cioms.ch/>.
- Csapó J, Lóki K, Csapó-Kiss Z, Albert C. 2005. Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying post-column derivatization. *Acta Agraria Kaposvárensis*. 9:33–51.
- De Mesa-Stonestreet N, Alavi S, Bean SR. 2010. Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. *J Food Sci*. 75:90–104.
- Diario Oficial de la Federación. 2001. Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999. Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals]. [Internet]. Diario Oficial de la Federación. [accessed 2013 Jan 15]. <http://senasica.gob.mx/?doc=743>.
- Duodu KG, Nunes A, Delgadillo I, Parker ML, Mills ENC, Belton PS, Taylor RN. 2002. Effect of grain structure and cooking on sorghum and maize *in vitro* protein digestibility. *J Cereal Sci*. 35:161–174.
- Duodu KG, Taylor JRN, Belton PS, Hamaker BR. 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J Cereal Sci*. 38:117–131.
- El Nour INA, Peruffo ADB, Curioni A. 1998. Characterisation of sorghum kafirins in relation to their cross-linking behavior. *J Cereal Sci*. 28:197–207.
- Elkin RG, Freed MB, Hamaker BR, Zhang Y, Parsons CM. 1996. Condensed tannins are only partially responsible for variations in nutrient digestibilities of sorghum grain cultivars. *J Agric Food Chem*. 44:848–853.
- Elkonin LA, Italianskaya JV, Fadeeva IV, Blychkova VV, Kozhemyakin VV. 2013. *In vitro* protein digestibility in grain sorghum: effect of genotype and interaction with starch digestibility. *Euphytica*. 193:327–337.
- Emmambux NM, Taylor JRN. 2003. Sorghum kafirin interaction with various phenolic compounds. *J Sci Food Agric*. 83:402–407.
- Fayyaz E, Naser MS. 2015. Effect of reconstitution of high tannin sorghum grain on small intestine morphometry of Japanese quails. *Trakia J Sci*. 13:77–82.
- Fialho ET, Lima JAF, De Oliveira V, Silva HO. 2002. Substituição do milho pelo sorgo sem tanino em rações de leitões: digestibilidade dos nutrientes e desempenho animal [The replacement of corn by sorghum without tannin in piglets feeding: digestibility and animal performance]. *Rev Bras Milho Sorgo*. 1:105–111. Portuguese.
- Fialho ET, Rodrigues PB, Lima JAF, Silva HO, Oliveira V. 2004. Performance and nutrient digestibility of low tannin sorghum fed to pigs from 10 to 30 kg. *J Anim Sci*. 82:22.
- Fushiki T, Iwai K. 1989. Two hypotheses on the feedback regulation of pancreatic enzyme secretion. *FASEB J*. 3:121–126.
- Gómez-Soto JG, Aguilera AB, Escobar GK, Mariscal-Landín G, Reis STC. 2015. Efecto del nivel de taninos del sorgo y del día postdestete sobre algunas características morfofisiológicas del aparato digestivo de lechones. [Effect of sorghum tannin levels and postweaning day on some morphophysiological characteristics of the digestive tract of piglets]. *Arch Latinoam Prod Anim*. 23:63–70. Spanish.
- Hamaker BR, Kirleis AW, Butler LG, Axtell JD, Mertz ET. 1987. Improving the *in vitro* protein digestibility of sorghum with reducing agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:626–628.
- Hamaker BR, Kirleis AW, Mertz ET, Axtell JD. 1986. Effect of cooking on the protein profiles and *in vitro* digestibility of sorghum and maize. *J Agric Food Chem*. 34:647–649.
- Hamaker BR, Mohamed AA, Habben JE, Huang CP, Larkins BA. 1995. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamins contents than the conventional method. *Cereal Chem*. 72:583–588.
- Hawkes R, Niday E, Gordon J. 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem*. 119:142–147.
- Jansman AJM, Enting H, Verstegen MWA, Huisman J. 1994. Effect of condensed tannins in hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) on the activities of trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1) in digesta collected from the small intestine of pigs. *Br J Nutr*. 71:627–641.
- Jansman AJM, Verstegen MWA, Huisman J. 1993. Effects of dietary inclusion of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low and high tannin content of condensed tannins on digestion and some physiological parameters in piglets. *Anim Feed Sci Technol*. 43:239–257.
- Jezierny D, Mosenthin R, Sauer N, Roth S, Piepho HP, Rademacher M, Eklund M. 2011. Chemical composition and standardized ileal digestibilities of crude protein and amino acids in grain legumes for growing pigs. *Livest Sci*. 138:229–243.
- Kumar T, Dweikat I, Sato S, Ge Z, Nersesian N, Chen H, Elthon T, Bean S, Iorger BP, Tilley M, et al. 2012. Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Biotechnol J*. 10:533–544.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the heat of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685.
- Le Gall M, Quillien L, Guéguen J, Rogniaux H, Séve B. 2005. Identification of dietary and endogenous ileal protein losses in pigs by immunoblotting and mass spectrometry. *J Nutr*. 135:1215–1222.
- Lee SH, Shinde PL, Choi JY, Kwon IK, Lee JK, Pak SI, Cho WT, Chae BJ. 2010. Effects of tannic acid supplementation on growth performance, blood hematology, iron status and faecal microflora in weanling pigs. *Livestock Sci*. 131:281–286.
- Lizardo R, Peiniau J, Aumaitre A. 1995. Effect of sorghum on performance, digestibility of dietary components and activities of pancreatic and intestinal enzymes in the weaned piglet. *Anim Feed Sci Technol*. 56:67–82.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall JR. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265–275.
- Mariscal-Landín G, Avellaneda JH, Reis de Souza TC, Aguilera BA, Borbolla GA, Mar B. 2004. Effect of tannins in sorghum on amino acid ileal digestibility and on trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1) activity of growing pigs. *Anim Feed Sci Technol*. 117:245–264.
- Mariscal-Landín G, Reis de Souza TC, Avalos MA. 2010. Ileal amino acids digestibility of sorghum in weaned piglets and growing pigs. *Animal*. 4:1341–1348.
- Mateus GP, Cruscio CAC, Pariz CM, Borghi E, Costa C, Martello JM, Franzluebbers AJ, Castilhos AM. 2016. Sidedress nitrogen application rates to sorghum intercropped with tropical perennial grasses. *Agron J*. 108:433–447.
- Mazhar H, Chandrashekar A. 1995. Quantification and distribution of kafirins in the kernels of sorghum cultivars varying in endosperm hardness. *J Cereal Sci*. 21:155–162.

- Monk R, Franks C, Dahlberg J. 2014. Sorghum. In: Smith S, Diers B, Specht J, Carver B, editors. *Yield gains in major U.S. field crops*. Vol. 33. Madison, Wisconsin, USA: CSSA Special Publication; p. 293–310.
- Mossé J, Huet JC, Baudet J. 1988. The amino acid composition of whole sorghum grain in relation to its nitrogen content. *Cereal Chem.* 65:271–277.
- Mueller-Harvey I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J Sci Food Agric.* 86:2010–2037.
- Nabuurs MJA, Hoogendoorn A, Van-Der-Molen EJ, Van-Osta LM. 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Res Vet Sci.* 55:78–84.
- [NRC] National Research Council. 2012. *Nutrient requirements of swine*, 11th ed. Washington (DC): The National Academy Press.
- Nunes A, Correia I, Barros A, Delgadillo I. 2005. Characterization of kafirin and zein oligomers by preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Agric Food Chem.* 53:639–643.
- Oom A, Pettersson A, Taylor JRN, Stading M. 2008. Rheological properties of kafirin and zein prolamin. *J Cereal Sci.* 47:109–116.
- Oria MP, Hamaker BR, Axtell JD, Huang CP. 2000. A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5065–5070.
- Oria MP, Hamaker BR, Shull JM. 1995. Resistance of sorghum  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -kafirins to pepsin digestion. *J Agric Food Chem.* 43:2148–2153.
- Piluzza G, Sulas L, Bullitta S. 2014. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass Forage Sci.* 69:32–48.
- Price ML, Van Scoyoc S, Butler LG. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J Agric Food Chem.* 26:1214–1218.
- Rakshit S, Hariprasanna K, Gomashe S, Ganapathy KN, Das IK, Ramana OV, Dhandapani A, Patil JV. 2014. Changes in area, yield gains, and yield stability of sorghum in major sorghum-producing countries, 1970 to 2009. *Crop Sci.* 54:1571–1584.
- Ramírez RE, Anaya EAM, Mariscal LG. 2005. Predicting the chemical composition of sorghum grain by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Tec Pecú Méx.* 43:1–11.
- Reboud JP, Ben AA, Desnuelle P. 1962. Variations de la teneur en enzymes de pâncreas de rat en fonction de la composition des régimes [Changes in rat pancreatic enzyme content in function of the composition of diets]. *Bioch Biophys.* 58:326–327. French.
- Rostagno HS, Teixeira ALF, Lopes DJ, Gomes PC, Flávia DOR, Lopes DC, Soares FA, de Toledo BSL. 2011. *Tablas brasileñas para aves y cerdos. Composición de alimentos y requerimientos nutricionales. [Brazilian tables for poultry and swine. Composition of feedstuffs and nutritional requirements]*. 3rd ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Volume 3. 3rd ed. New York (NY): CSHL Press. Appendix 9, Detection systems; p. A9.28.
- [SAS] Statistical Analysis System. 2008. *User's guide*, version 9.2. Cary (NC): SAS Institute Inc.
- Sato K, Yamagishi T, Yamauchi F. 1986. Quantitative analysis of soybean proteins by densitometry on gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 63:493–496.
- Selle PH, Cadogan DJ, Li X, Bryden WL. 2010. Implications of sorghum in broiler chicken nutrition. *Anim Feed Sci Technol.* 156:57–74.
- Serrano J, Puupponen-Pimia R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F. 2009. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res.* 53:5310–5329.
- Steel RGD, Torrie JH. 1980. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 2nd ed. New York (NY): McGraw-Hill.
- Stills HF. 2012. *Polyclonal antibody production*. In: Suckow MA, Stevens KA, Wilson RA, editors. *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*. 1st ed. San Diego (CA): Academic Press; p. 259–274.
- Taylor J, Bean SR, Ioeberger BP, Taylor JRN. 2007. Preferential binding of sorghum tannins with  $\gamma$ -kafirin and the influence of tannin binding on kafirins digestibility and biodegradation. *J Cereal Sci.* 46:22–31.
- Thaela MJ, Pierzynowski SG, Jensen MS, Jakobsen K, Westrom BR, Karlsson BW. 1995. The pattern of the circadian rhythm of pancreatic secretion in fed pigs. *J Anim Sci.* 73:3402–3408.
- Van Parys A, Boyen F, Dewulf J, Haesebrouck F, Pasmans F. 2010. The use of tannins to control *Salmonella typhimurium* infections in pigs. *Zoonoses Public Health.* 57:423–428.
- van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Westmeier R. 2011. Electrophoresis in gel. In: Janson JC, editor. *Protein purification. Principles, high resolution methods, and applications*. 3rd ed. Hoboken, New Jersey, USA: Wiley; p. 365–377.
- Wong JH, Lau T, Cai N, Singh J, Pedersen JF, Vensel WH, Hurkman WJ, Wilson JD, Lemaux PG, Buchanan BB. 2009. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *J Cereal Sci.* 49:73–82.
- Wong JH, Marx DB, Wilson JD, Buchanan BB, Lemaux PG, Pedersen JF. 2010. Principal component analysis and biochemical characterization of protein and starch reveal primary targets for improving sorghum grain. *Plant Sci.* 179:598–611.
- Wu Y, Li X, Xiang W, Zhu C, Lin Z, Wu Y, Li J, Pandravada S, Ridder DD, Bai G, et al. 2012. Presence of tannins in sorghum grains is conditioned by different natural alleles of *Tannin 1*. *PNAS. Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:10281–10286.
- Xiao J, Li Y, Li J, Gonzalez AP, Xia Q, Huang Q. 2015. Structure, morphology, and assembly of kafirin. *J Agric Food Chem.* 63:216–224.



## **8.2. Anexo 3**

Gómez SJG, Mariscal LG, Reis STC, Aguilera BA, Escobar GK, Bernal SMG. Efecto del nivel de taninos y kafirinas del sorgo en la expression de los genes eIF2B1 y eIF4e en cerdos en crecimiento-finalización. (Borrador).

# Efecto del consumo de sorgo con diferentes niveles de taninos y kafirinas sobre la expresión de los genes eIF2B1 y eIF4e en cerdos en crecimiento-finalización

J. G. Gómez<sup>1</sup>, T.C. Reis<sup>1</sup>, G. Mariscal<sup>2</sup>, A. Aguilera<sup>1</sup>, K. Escobar<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, México.

<sup>2</sup> CENID-Fisiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colón, Querétaro, México.

**Palabras clave:** taninos, kafirinas, cerdos, expresión de genes, eIF2B1, eIF4e.

## Introducción

El sorgo es un cereal empleado para la alimentación humana y del ganado (Wong *et al.*, 2009; Srinivasa y Ganesh, 2013), el cual posee propiedades químicas muy similares al maíz, pero que en el proceso digestivo al ser consumido por los cerdos, puede tener efectos detrimentales en el aprovechamiento de los nutrientes debido a la presencia de taninos que forman complejos con proteínas dietarias y endógenas, como las enzimas digestivas (Serrano *et al.*, 2009; Jezierny *et al.*, 2011), lo que puede ocasionar una menor absorción de nutrientes, y por lo tanto, una mayor excreción de dichos nutrientes no digeridos y absorbidos hacia el medio ambiente. Elkin *et al.* (1996) mencionan que la baja digestibilidad proteica del sorgo se presenta aún en los sorgos con bajo contenido de taninos, por lo que la naturaleza o perfil de las proteínas es uno de los factores responsables de la digestibilidad baja del grano de sorgo (Salinas *et al.*, 2006). Las kafirinas son las proteínas más abundantes del sorgo, son solubles en alcohol y son las últimas proteínas de este cereal en ser digeridas (Hamaker *et al.*, 1986), en parte por su alto contenido de prolina, aminoácido con gran afinidad para unirse a los taninos y fomentar la formación de los complejos taninos-kafirinas (Taylor *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 1997; Piluzza *et al.*, 2013), que pueden afectar la cantidad de nutrientes absorbidos y disponibles a nivel celular. La nutrición, que permite la disponibilidad de nutrientes como aminoácidos en el cuerpo de los animales, tiene relación directa con la expresión de los genes, los cuáles están involucrados en la regulación del desarrollo de los animales (Sato, 2016) y dentro de los genes que han sido evaluados en cerdos, relacionados con la alimentación, se encuentran aquellos que codifican proteínas que participan en el inicio de la síntesis de proteína a nivel del músculo esquelético, como lo son los genes eIF2B1 y eIF4e, que cuando se compara el nivel de proteína dietaria pueden verse influenciados en su expresión (Escobar *et al.*, 2006; Suryawan *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014). El objetivo del presente trabajo fue evaluar si el nivel de taninos y/o kafirinas del sorgo consumido por los cerdos en crecimiento-finalización afecta la expresión de los genes eIF2B1 y eIF4e involucrados con el inicio de la síntesis de proteína a nivel muscular.

## Material y métodos

### Animales, alojamiento y tratamientos experimentales

El experimento se desarrolló en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y

Pecuarías (INIFAP) en México. El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. (autorización: 90-FCN-2014). Los cerdos utilizados en este estudio fueron atendidos de acuerdo con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" "NOM-062-ZOO-1999" (DOF, 2001) y de los lineamientos establecidos en el *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (CIOMS/ICLAS, 2012). Los análisis de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Naturales.

La composición química de cuatro híbridos de sorgo y un maíz utilizados en el experimento fue determinada antes de formular las dietas (Cuadro 1). Se analizó el contenido de kafirinas verdaderas (Hamaker *et al.* 1995), así como el contenido de taninos condensados de los híbridos de sorgo (Price *et al.* 1978). Posteriormente se clasificaron los cuatro híbridos de sorgo en: bajo en taninos y kafirinas (BTBK), bajo en taninos y alto en kafirinas (BTAK), alto en taninos y bajo en kafirinas (ATBK) y alto en taninos y kafirinas (ATAK) (Tabla 1). La energía neta del sorgo y del maíz se cuantificaron mediante calorimetría (Bateman 1970). La proteína cruda, las cenizas y el extracto etéreo se determinaron mediante las técnicas descritas en el AOAC (2002): 976.05, 923.03 y 920.35, respectivamente. También se cuantificó la fibra detergente neutra (van Soest *et al.*, 1991). La determinación de aminoácidos se realizó de acuerdo con el método 994.12 del AOAC (2002), que implicó que las muestras se hidrolizaron a 110 °C durante 24 h en HCl 6M. La cuantificación de aminoácidos se realizó mediante intercambio iónico, aplicando la prueba de derivatización posterior a la columna en una HPLC (HPLC Modelo 1100, Hewlett Packard®), la cual estaba unida a un Pickering Pinnacle PCX. Para determinar el contenido de metionina y cisteína, se realizó una oxidación previa con ácido per fórmico (Csapó *et al.* 2005).

De acuerdo a los resultados del análisis químico de los ingredientes principales, se formularon cinco diferentes dietas de harina de soya y cereales: una dieta a base de maíz (dieta de control; C); dietas basadas en sorgo: baja en taninos y kafirinas (BT-BK), baja en taninos y alta en kafirinas (BT-AK), dieta alta en taninos y baja en kafirinas (AT-BK) y dieta alta en taninos y kafirinas (AT-AK). Todas las dietas se formularon usando el concepto de proteína ideal de acuerdo con los requerimientos de aminoácidos digestibles recomendada por el NRC (2012) para las fases de crecimiento (FC) y de finalización (FF). Las dietas fueron isocalóricas (3300 kcal / kg) y proporcionaron 0.88% y 0.74% de lisina digestible en la etapa FC y FF, respectivamente (Cuadro 2).

En el experimento se emplearon 60 cerdos (GP8 x Fertilis 25 PIC®) de ambos sexos, con un peso corporal (BW) promedio de 54.0 ± 12.35 kg. El peso corporal inicial fue balanceado en todos los tratamientos. Los cerdos se alojaron individualmente en corrales de piso equipados con un bebedero de chupón. Los cerdos tuvieron acceso *ad libitum* al agua y a las dietas experimentales. Se asignaron aleatoriamente seis cerdos machos y seis hembras a cada una de las cinco dietas experimentales. Los cerdos se alimentaron con las dietas formuladas para la FC durante 28 días y para las dietas de la FF durante 28 días también. El consumo de alimento se midió diariamente. Los cerdos se pesaron al comienzo

y al final de cada fase. Se registraron el consumo diario de alimento (CDA) y la ganancia diaria de peso (GDP), y se calculó la eficiencia alimenticia (EA) para cada fase.

### Colecta de los tejidos

En el día 0 (tiempo 1), 28 (tiempo 2) y 56 (tiempo 3) del experimento, se recogieron muestras (biopsias) en el punto P2 del músculo *longuissimus dorsi* de tres machos y tres hembras asignados a cada dieta. Los cerdos se anestesiaron con ketamina (20 mg / kg peso vivo) y xilazina (2 mg / kg peso vivo) por vía intramuscular (Swindle, 1998), inyectados en el cuello en una sola dosis. Una vez que los cerdos estuvieron anestesiados, la parte posterior de los animales fue lavada con un cepillo empleando jabón quirúrgico. El área en el punto P2 del cuerpo (6.3 cm lateral a la línea lumbar en la décima costilla) (Santana, 2008) fue rasurada, limpiada con un trapo seco y posteriormente se colocó yodo. Posterior al yodo, se inyectaron por vía subcutánea 2 ml de hidrocloreuro de lidocaína (20 mg / ml) mas epinefrina (0,005 mg / ml) y se realizó una incisión de 0.5 cm de ancho sobre la piel. Se tomaron las muestras en el punto P2 del músculo *longuissimus dorsi*, empleando una pistola de biopsia automática con agujas desechables tipo Tru-Cut (Cat. 360015, Histo DANA 2.2 MG) con una penetración de 2.2 cm (Cat. 551210, Histo Biocore II MG). Las muestras se colocaron en viales que contenían 0.25 ml del reactivo TRIzol® (Cat. 15596, ambion®) y se mantuvieron a -80 °C hasta que se extrajo el ARN. La primera y la tercera vez que se tomaron las muestras, éstas se tomaron del lado derecho y en el segundo muestreo del lado izquierdo. Después del muestreo, para cerrar la incisión, se colocó sobre la piel cianoacrilato (kola loka®; Singer *et al.* 2008) y posteriormente furazolidona (7.5%) en *spray* en el área de la biopsia.

### Extracción de RNA total y cuantificación

Las muestras del músculo *longuissimus dorsi* se colocaron en viales que contenían 1 ml del reactivo TRIzol® y perlas de cerámica de 2.8 mm (Cat. 13114, MO BIO Labs.). Utilizando una máquina homogeneizadora (Cat. 13155, MO BIO Labs.) las muestras se lisaron siguiendo el protocolo 3500 - 2x45 s- 30 s (velocidad- número de ciclos y tiempo-tiempo pausado) según lo recomendado por el fabricante. Posteriormente el ARN se aisló usando el reactivo TRIzol® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA purificado se resuspendió en 40 µl de agua destilada libre de RNasa y se almacenó a -80 °C. La concentración total de ARN se determinó espectrofotométricamente (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific Inc.) a 260 nm, y se evaluó la pureza del ARN usando la relación A260/A280, que varió de 1.8 a 2.0 en las muestras (Sambrook y Russell, 2001). La integridad del ARN total se evaluó mediante electroforesis utilizando geles de agarosa al 1.5%.

### Síntesis de cDNA

Se trató 1 µg del ARN total de cada muestra con 1 U de desoxirribonucleasa I grado amplificación (Cat. 18068, Invitrogen®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa se inició con 1 µg de ARN tratado con DNasa, el cual estaba contenido en 10 µl de agua destilada libre de RNasas, se añadieron 1 µl de oligo(dT)<sub>12-18</sub> *primer* (Cat.18418, Invitrogen®) y 1 µl de solución de dNTPs (10 µm cada uno, Cat.

10297, Invitrogen®). La solución se calentó a 65 °C durante 5 minutos, y se enfrió rápidamente sobre hielo. Posteriormente se agregaron a la mezcla 4 µl de amortiguador 5X *first strand*, 2 µl de 0.1 M DTT y 1 µl de inhibidor de ribonucleasa recombinante (Cat.10777, Invitrogen®), y esta solución se incubó a 42 °C durante 2 minutos. Se añadieron inmediatamente 200 U de transcriptasa reversa (Cat. 18064, Invitrogen™). La reacción de transcripción reversa se incubó a 42 °C durante 50 minutos, seguido de 15 minutos a 70 °C, y finalmente se enfrió en hielo para detener la reacción. Los viales se conservaron a -20° C.

#### PCR tiempo real o cuantitativo

La abundancia relativa de la transcripción se determinó utilizando el valor de Ct obtenido mediante PCR cuantitativo o PCR en tiempo real (qPCR), para lo cual se corrieron triplicados para cada muestra y genes evaluados dentro de las muestras. Se empleó un sistema de tiempo real CFX96™ y un termociclador modelo C1000® (Bio-Rad). El volumen total para cada reacción contenía 2.75 µl de agua destilada libre de RNasas, 6.25 µl de Maxima SYBR Green Master Mix (Cat. K0221, Thermo Scientific), 1.125 µl de cada *primer forward* (sentido) y *reverse* (antisentido) específico para cada gen a 10 µM, así como 1.25 µl de cADN de cada muestra, teniendo un volumen final de 12.5 µl. Los *primers* que se usaron para los genes constitutivos o endógenos (*housekeeping*) de β-actina y HPRT, así como de los genes de interés eIF2B1 y eIF4e fueron:

β-actina	5'-GTCCACTCCGCCAGCACAG-3'	(sentido)	y	5'-
	CATCGTCGCCCCGCAAAGC-3'	(antisentido);		HPRT
	GGTCAAGCAGCATAATCCAAAG-3'	(sentido)	y	5'-
	CAAGGGCATAGCCTACCACAA-3'	(antisentido);		eIF2B1
	AGCCAAGAAGCGTTTCAGTGT-3'	(sentido)	y	5'-
	CTTGCTGATTTAGTGGGAAGAGCC-3'	(antisentido);		eIF4e
	TGGTATTGAGCCTATGTGGGAAGATGAG-3'	(sentido)	y	5'-
	TGGTGGAGCCGCTCTTAGTAGC-3'	(antisentido).		

Las condiciones usadas para la amplificación y cuantificación fueron: una etapa de desnaturalización inicial (95 °C durante 3 minutos), seguida de 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, alineamiento de *primers* a 63 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 30 segundos) y, finalmente, una curva de alineamiento o *melting curve* (63-95 °C). La fluorescencia se midió al final de cada ciclo y cada 0.5 °C durante la curva de alineamiento. El primer ciclo en la región logarítmica de amplificación en la que se detectó un aumento significativo de la fluorescencia por encima del fondo se designó como el ciclo umbral (Ct). La amplificación de los genes más expresados en cada muestra se detecta en un número de ciclo (Ct) inferior que los genes expresados en menor medida, dada la mayor abundancia de transcritos de RNA en el tejido muscular a partir del cuál se sintetizó el cDNA. Los genes expresados en menor medida se detectan en ciclos (Ct) posteriores durante el PCR; por lo tanto, el valor de Ct y la expresión de genes están inversamente relacionados (Gunawan *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009). El valor de ΔCt se determinó restando a el promedio de la suma del Ct de los genes endógenos β-actina y HPRT el Ct de los genes de interés (eIF2B1 y eIF4e) para cada muestra (Guo *et al.*, 2011). El valor de ΔCt de cada gen de interés se analizó por separado (Duran-Montgé *et al.*, 2009).

#### Análisis estadístico

Las variables analizadas en la prueba de comportamiento en cada etapa fueron: CDA, GDP, EA y BW final (PF), usando el valor de estas variables en el tiempo 1 como covariable. Para la abundancia relativa de la transcripción de los genes de interés (eIF2B1 y eIF4e) en el tiempo 2 y el tiempo 3, los datos de  $\Delta Ct$  se analizaron usando los valores en el tiempo 1 como covariable. Los valores de CDA, GDP, EA y PF, así como los  $\Delta Ct$  de los genes eIF2B1 y eIF4e, se analizaron mediante un diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo factorial 2 x 5 (2 sexos, 5 tratamientos). La comparación de las medias de los tratamientos experimentales se realizó mediante contrastes ortogonales, evaluando el efecto del cereal (maíz vs sorgo), el efecto de los taninos dentro del sorgo (taninos bajos vs taninos altos) y el efecto de las kafirinas dentro del sorgo (bajo nivel de kafirinas vs alto nivel de kafirinas), así como la interacción taninos\*kafirinas. Se usó un valor de  $\alpha$  de 0.05 para aceptar las diferencias estadísticas, y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey usando el procedimiento Proc Mix de SAS (2008).

## Resultados

En el Cuadro 3 se muestran los resultados del comportamiento productivo de los cerdos. La fase de producción afectó las variables evaluadas, teniendo un menor CDA ( $P < 0.0001$ ), GDP ( $P < 0.01$ ) y una mayor EA ( $P < 0.0001$ ) en la FC respecto a la FF.

La dieta experimental sólo afectó el CDA ( $P < 0.05$ ), siendo mayor en los animales que consumieron la dieta BT-AK respecto a los que consumieron la dieta AT-AK.

El sexo de los animales afectó el CDA ( $P < 0.0001$ ), GDP ( $P < 0.01$ ), EA ( $P = 0.001$ ) y PF ( $P < 0.0001$ ). Los machos tuvieron un mayor CDA, GDP y PF, así como una menor EA respecto a las hembras.

El nivel de kafirinas dentro de las variedades de sorgo consumido no afectó las variables productivas evaluadas ( $P > 0.05$ ).

Para el CDA, también existió una interacción taninos\*kafirinas ( $P < 0.05$ ), en la cual cuando los cerdos consumieron una dieta elaborada con sorgos con alto contenido de kafirinas, si dicho sorgo tenía alto nivel de taninos se afectó negativamente este parámetro, haciéndolo menor.

Para la GDP se presentó una interacción entre la fase y la dieta consumida ( $P < 0.05$ ). En la FF los cerdos que consumieron las dietas C y AT-BK presentaron una mayor GDP que los que consumieron las dietas BT-BK y AT-AK. La GDP fue mayor en la FF para los cerdos que consumieron la dieta de maíz y AT-BK respecto a la FC.

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de la expresión de los genes. Para el gen eIF2B1 se presentó una interacción entre la fase de producción y la dieta consumida ( $P < 0.05$ ), siendo mayor su expresión en los cerdos que consumieron la dieta AT-AK y BT-BK respecto a los que consumieron la dieta de maíz y AT-BK, de igual manera los cerdos que consumieron las dietas elaboradas con los sorgos bajos en taninos expresaron más este



gen que los que consumieron la dieta AT-BK. La expresión del gen eIF2B1 en la FF fue menor para los cerdos que consumieron la dieta AT-BK y mayor para los que consumieron la dieta AT-AK respecto a la FC.

Para el gen eIF2B1 también se presentó una interacción entre el sexo de los cerdos y la dieta consumida ( $P < 0.05$ ). Los machos que consumieron las dietas BT-BK y AT-AK expresaron más este gen que los que consumieron las dietas de maíz y AT-BK. Los cerdos que consumieron la dieta AT-BK expresaron menos este gen que los que consumieron la dieta BT-AK. Las hembras expresaron menos el gen eIF2B1 cuando consumieron las dietas BT-AK y AT-AK respecto a los machos.

Respecto al gen eIF4e, durante la FC se expresó menos que durante la FF.

## **Discusión**

La fase productiva, relacionada con la edad y el BW, afectó las variables del comportamiento productivo evaluadas. Lo anterior está relacionado con una capacidad de mayor peso (y volumen) en el estómago que se puede dar a una mayor edad (Casas *et al.*, 2009). Braña (2007) describe que los cerdos al tener una mayor capacidad de consumo tienden a crecer más rápido, por lo que los cerdos pudieron tener un mayor CDA que permitió una mayor GDP en la FF respecto a la FC.

El crecimiento del cerdo depende del aumento de tamaño de los componentes corporales que se dan en proporción a la madurez del animal, como se observa en nuestros resultados, ya que la mayor GDP se observa en la FF. Lo anterior debe ser considerado en los procesos de producción pecuaria, ya que inicialmente el tejido con mayor prioridad de crecimiento es el tejido nervioso, seguido del óseo que da sostén a los demás tejidos, posteriormente el tejido muscular tiene prioridad sobre el graso y lo anterior cambia con el tiempo, puesto que conforme se va acercando a la madurez, el tejido graso comienza a tener un crecimiento dominante sobre el muscular (Braña, 2007; Garcés, 2010).

La producción porcina es una industria de transformación y como tal se debe lograr una adecuada EA, ya que el rubro que más impacta en los costos de producción es la alimentación, con un porcentaje que fluctúa entre el 57-80% del costo total de producción, dependiendo si es un sistema tecnificado o semitecnificado (Gómez *et al.*, 2008; CGG, 2009), por lo que se debe evaluar este parámetro productivo relacionado con el CDA y la GDP. La EA representa la interacción entre la tasa de ganancia corporal, la naturaleza del tejido depositado y las ineficiencias de los procesos digestivos. El crecimiento del lechón hasta los 70 d de edad (con un peso aproximado de 30 kg) está más influenciado por el ambiente y por los genes maternos, más que por los propios genes del lechón (Solanes *et al.*, 2004). Se debe considerar que de forma general la distribución de nutrientes en el cerdo está influenciada por el genotipo, el sexo, estatus hormonal, etapa de crecimiento, así como por factores medioambientales como el manejo alimenticio y el clima (Claus y Weiler, 1994; Carrol *et al.*, 1999). En el cerdo durante la etapa de crecimiento (menos de 60 kg PV), la ingesta de energía determina la tasa de deposición de proteína corporal (Schinckel y Lange, 1996). En los cerdos más pesados el genotipo determina la deposición de proteína corporal, aunque también el peso, edad, sexo, ambiente, estado inmunitario y

nutrición influyen en esta capacidad de deposición proteica (Braun *et al.*, 2007; Schinckel *et al.*, 2003). Los cerdos mayores de 60 kg presentan una menor EA y mayor deposición de tejido graso que los animales de menor peso (Corino *et al.*, 2008; Schinckel y Lange, 1996), hecho observado en nuestros resultados, ya que durante la FF, es decir a mayor edad y BW, la EA fue menor que durante la FC, es decir, los cerdos deben consumir mayor cantidad de alimento para depositar 1 kg de BW a mayor edad o peso.

El sexo de los animales afectó todos los parámetros productivos evaluados, coincidiendo con lo descrito con Shimada y Rentería (2010), siendo los machos los que tuvieron un mayor CDA, GDP y un PF también mayor. Se pueden presentar tres tipos de animales en lo referente al sexo: machos enteros, machos castrados y hembras, presentando diferencias importantes entre ellos referente a la velocidad de crecimiento, CDA y EA (Ciria y Garcés, 1996), como se observó en el presente experimento. La castración se realiza para facilitar el manejo de los animales y permitir la crianza de sexos mezclados, así como para evitar el olor sexual en las canales (Ciria y Garcés, 1996; Diestre, 1996), ya que es un olor desagradable que puede dar un mal olor durante la cocción y un mal sabor a la carne del cerdo (Bonneau *et al.*, 2000). En el cerdo macho entero existe menos grasa corporal que los machos castrados y las hembras, por lo que poseen mejor EA, dado que la producción de 1 kg de grasa corporal requiere más alimentos que la formación de 1 kg de músculo o hueso (Álvarez *et al.*, 2009). Los andrógenos, especialmente testosterona, producidos por los testículos aumentan la proporción de músculo y disminuyen la proporción de grasa dorsal (Cancellón, 1991; Jiménez, 2010). Díaz *et al.* (1990) hallaron que la GDP fue igual entre machos enteros y castrados pero ambos grupos de animales fueron 5% superiores al grupo de hembras. Campbell y King (1982) encontraron que los machos enteros ganaron más peso diariamente que los castrados, al igual que Wood y Riley (1982). Los machos enteros consumen menos alimento (13.6%) que los castrados (Wood y Riley, 1982; Díaz *et al.*, 1990) y hembras (Díaz *et al.*, 1990), probablemente porque los machos castrados presentan hiperfagia (Mariscal, 2007). Los machos castrados consumen más alimento que las hembras (Díaz *et al.*, 1990) como se observa en nuestros resultados. Ciria y Garcés (1996) mencionan que la EA es mejor en machos enteros que en las hembras y éstas a su vez más eficientes que los machos castrados, tal y como se observa en nuestros resultados, ya que las hembras tuvieron mayor ganancia de BW por cada kg de alimento consumido durante el experimento. La mejor conversión alimenticia de los machos enteros se debe a la acción que ejercen los esteroides testiculares principalmente andrógenos y estrógenos que actúan de forma sinérgica, produciendo un efecto anabólico y androgénico (Díaz *et al.*, 1990), ya que los estrógenos aumentan la ganancia de peso y mejoran los índices de conversión alimenticia y los andrógenos estimulan el apetito y favorecen la retención de N a nivel muscular (Cancellón, 1991).

La dieta consumida, elaborada con cereales con diferentes características químicas, sólo afectó el CDA. A pesar de que en la literatura se indica que la inclusión dietaria de niveles elevados de taninos reduce la GDP y el CDA, al afectar negativamente la palatabilidad debido a sus propiedades astringentes (Jezierny *et al.*, 2010), a pesar de que se altera la EA y reduce la digestibilidad aparente de la proteína cruda en cerdos (Jansman *et al.*, 1994; Reyes *et al.*, 2000; Vitti *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010), en el presente experimento sólo se afectó negativamente el CDA entre los cerdos que consumieron

sorgos con elevados niveles de taninos. Mariscal-Landín *et al.* (2004) observaron un efecto detrimental neto de los taninos sobre la digestibilidad de las proteínas cuando éstos se encuentran en más de 4% en el grano de sorgo en cerdos de más de 50 kg de peso vivo (PV), por lo que se esperaba que en los cerdos del presente experimento también se hubiera afectado la GDP y la EA por el consumo elevado de sorgos con alto contenido de taninos. Sin embargo, en este trabajo las dietas se formularon mediante el concepto de aminoácidos digestibles, y por tal, se corrigió la cantidad aportada de los aminoácidos dietarios considerando la menor digestibilidad teórica de los aminoácidos en los sorgos con alto contenido de taninos, por lo que este efecto negativo desapareció. Fialho *et al.* (2004) indican que el sorgo bajo en taninos puede ser utilizado para reemplazar el maíz en dietas para cerdos, sin afectar el CDA, la GDP y la EA, como quedó evidenciado en los resultados del presente experimento, aunque el empleo de sorgos con elevado contenido de taninos tampoco afectó las variables productivas evaluadas comparadas con el consumo de maíz.

El sorgo puede contener más proteína cruda que el maíz, sin embargo su proteína es menos digestible y varía en función de la cantidad de taninos presentes y por el tipo de proteína (kafirinas). Elkin *et al.* (1996) mencionan que la baja digestibilidad proteica del sorgo se presenta aún en variedades con bajo contenido de taninos. Oria *et al.* (2000) describen que las kafirinas, almacenadas en el grano en forma de cuerpos proteicos (Jondreville *et al.*, 2001; Duodu *et al.*, 2003), es otro de los factores responsables de la digestibilidad baja de este cereal (Jondreville *et al.*, 2001), lo cuál podría afectar negativamente las variables productivas en los cerdos. El contenido promedio de kafirinas del sorgo es de 49.3%, variando entre 37.5 y 72.9% (Selle *et al.* 2010). Gómez *et al.* (2017) sugieren que a nivel digestivo la presencia simultánea de altos niveles de taninos y kafirinas podría afectar el aprovechamiento digestivo de la proteína, principalmente las diversas fracciones de kafirinas. Sin embargo, en el presente experimento, el nivel de las kafirinas de los sorgos consumidos no afectó ninguna de las variables productivas evaluadas. Las kafirinas del sorgo son proteínas ricas en prolina, siendo este un aminoácido con una alta afinidad por los taninos, formando complejos taninos-kafirinas, lo que reduce aún más la posibilidad de la acción enzimática sobre estas proteínas (Emmambux and Taylor 2003), disminuyendo la digestibilidad de la mayoría de los aminoácidos esenciales (Jansman *et al.* 1993), sobre todo cuando los taninos se encuentran en un nivel superior al 4% en el grano del sorgo (Mariscal-Landín *et al.* 2004). Como consecuencia de la baja digestibilidad de la proteína del sorgo alto en taninos descrita en la literatura y a la presencia de altos niveles de kafirinas, que son las últimas proteínas del sorgo en ser digeridas (Hamaker *et al.* 1986; Oria *et al.* 1995), se esperaba una disminución en el aprovechamiento digestivo de las proteínas del sorgo (Mariscal-Landín *et al.* 2010), afectando negativamente los parámetros evaluados en los animales que consumieron las dietas altas en kafirinas y taninos (AT-AK), hecho que ocurrió sólo con el CDA, ya que existió una interacción taninos\*kafirinas.

La interacción presentada fase\*dieta para la GDP, no permite hacer conclusiones respecto al efecto del nivel de taninos y kafirinas de acuerdo a la fase productiva, por lo que se debe seguir evaluando el papel de ambos factores, tanto taninos y kafirinas, sobre el comportamiento productivo de los cerdos.

Si los taninos y kafirinas pueden llegar a afectar el proceso digestivo (Gómez et al., 2017) y por tal la disponibilidad de nutrientes a nivel de las fibras musculares esqueléticas, es que desarrollamos este experimento para relacionar el nivel de taninos y kafirinas con la expresión de los genes eIF2B1 y eIF4e, que están involucrados en el inicio de la síntesis de proteína muscular (Liu et al., 2013). Aunque las dietas que se ofrecieron a los cerdos en este experimento fueron isocalóricas y se formularon para cubrir los requisitos de los aminoácidos digestibles en la FC y FF, las dietas ofrecidas a los cerdos, el tipo de cereal, el sexo, así como el nivel de taninos y kafirinas no afectaron la expresión de los genes eIF2B1 y eIF4e. En particular para la FF, el gen eIF4e sí se expresó más. Probablemente, debido a que las dietas se formularon en base a aminoácidos digestibles, es que no hubo un efecto por el nivel de taninos y kafirinas que tenían los sorgos con los que se formularon las dietas sobre la expresión de los genes evaluados, ya que independientemente de los efectos negativos que pudiesen existir por el consumo de elevados niveles de estos dos factores, hubo los aminoácidos disponibles a nivel de las fibras musculares para que los cerdos se desarrollaran de igual manera independientemente del cereal consumido. Lo que se presentó en este experimento fue una interacción fase\*dieta, pero no queda evidenciado un efecto detrimental por el consumo o de altos niveles de taninos o kafirinas sobre la expresión de los genes evaluados, aunque sí de que cereales con diferente composición química llegan a afectar este parámetro fisiológico.

El hecho de que los machos presentaron diferencias en la expresión del gen eIF2B1 de acuerdo a la dieta consumida (interacción sexo\*dieta), indica que sí hay un efecto dado por el sexo animal de acuerdo a la dieta consumida, pero no queda evidenciado que los taninos y/o kafirinas fueran los responsables de esta diferencia en la expresión del gen por lo que se debe seguir investigando en cerdos consumiendo sorgos con diferentes niveles de taninos y kafirinas qué es lo que realmente afecta la expresión de los genes relacionados con el inicio de la síntesis de proteína muscular.

Brameld *et al.* (1999), Drew *et al.* (2012) y Martínez *et al.* (2013) describen que la síntesis de proteína no sólo es afectada por el consumo de nutrientes (de manera particular de la presencia de aminoácidos) y la secreción de insulina (Rooyackers y Nair, 1997) sino que la fase de crecimiento del animal influye de manera directa. Para el gen eIF4e se observó una mayor expresión al final del experimento, respecto a la FC. Liu *et al.* (2014) describen que hay reportes que indican que el incremento de la síntesis de proteína muscular esquelética está influenciado por la expresión de los factores de inicio de la traducción eucarióticos incluyendo eIF2B y eIF4E, por lo que se esperaría una mayor deposición de proteína muscular en los cerdos durante la FF, hecho que quedó parcialmente evidenciado dado que la GDP durante esta fase fue mayor, aunque faltaría corroborar que lo que más se depositó en esta fase fue músculo esquelético y no otro tipo de tejido corporal.

## **Conclusión**

Bajo las condiciones experimentales en las que se desarrolló el presente trabajo, se concluye que el cereal consumido por los cerdos, y en particular considerando el nivel de taninos, durante la etapa de crecimiento-finalización debe ser considerado ya que puede afectar algunos parámetros productivos. En particular el consumo de elevados niveles

tanto de taninos y kafirinas afectó el CDA. Por sí solas, las kafirinas no afectaron ninguno de los parámetros evaluados. La fase productiva del cerdo y el sexo afectaron las variables productivas evaluadas. Se debe continuar investigando el efecto del consumo de taninos y kafirinas sobre la expresión de los genes relacionados con el inicio de la síntesis de proteína muscular, ya que en el presente experimento no hubo evidencia de que el consumo de elevados niveles de taninos y kafirinas afecte dicha expresión. La expresión del gen eIF2B1 fue influenciado por la dieta consumida según el sexo y edad, mientras que la expresión del gen eIF4e es influenciado sólo por la edad independientemente del cereal consumido.

## **Referencias bibliográficas**

- Álvarez DA, Pérez EH, Martín HTC, Quincosa TJ, Sánchez PA. 2009. Fisiología animal aplicada. Universidad de Antioquia. Colombia. Pp 382.
- [AOAC] Association Official Analytical Chemists. 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Bateman JV. 1970. Nutrición animal: manual de métodos analíticos [Animal nutrition: manual of analytical methods]. México: Herrero Hnos., Sucesores, S.A.
- Baxter NJ, Lilley TH, Haslam E, Williamson MP. 1997. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochem.* 36: 5566-5577.
- Bonneau M, Walstra P, Claudi-Magnussen C. 2000. An international study on the importance of androstenone and skatole for boar taint: IV. Simulation studies on consumer dissatisfaction with entire male pork and the effect of sorting carcasses on the slaughter line, main conclusions and recommendations. *Meat Sci.* 54: 285-295.
- Brameld JM, Gilmour RS, Buttery PJ. 1999. Glucose and amino acids interact with hormones to control expression of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA in cultured pig hepatocytes. *J Nutr.* 129 (7): 1298-1306.
- Braña VD. 2007. Crecimiento en cerdos. En: Estrategias de alimentación y manejo del cerdo. Publicación Técnica No. 3. Autores: Gómez RS, Mariscal LG, Mejía GCA, Braña VD, Salazar GG. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP-SAGARPA. Colón, Querétaro, México.
- Braun RO, Pattacini SH, Scoles GE, Cervellini JE. 2007. Productividad y calidad de grasa corporal en cerdos alimentados con cereales crudos y extruidos. *Arch Zootec.* 56: 299-308.
- Campbell R, King R. 1982. The influence of dietary protein and level of feeding on the growth performance and carcass characteristics of entire and castrated male pigs. *Anim Sci.* 35: 177-184.
- Cancellón A. 1991. Tratado de porcicultura. La canal y la carne porcina. Tomo III. Aedos. Barcelona, España. Pp. 415.
- Carrol JA, Buonomo FC, Becker BA, Matteri RL. 1999. Interactions between environmental temperatura and porcine growth hormone (pGH) treatment in neonatal pigs. *Domest Anim Endocrinol.* 16: 103-113.

- Casas GA, Afanador G, Rodríguez D. 2009. Componentes anatómicos y coeficientes alométricos en cerdos machos castrados desde el nacimiento. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 22: 156-167.
- [CGG] Coordinación General de Ganadería. 2009. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de porcino en México 2009 [Internet]. SAGARPA, Coordinación General de Ganadería. [revisado 09 de marzo del 2016]. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situacin%20actual%20y%20perspectiva/Attachments/27/sitpor09a.pdf>
- [CIOMS/ICLAS] Council for the international organization of medical sciences and International council for laboratory animal science. International guiding principles for biomedical research involving animals. 2012. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals [Internet]. CIOMS/ICLAS. [revisado 15 enero 2013]. Disponible en: <http://www.cioms.ch/>
- Ciria J, Garcés C. 1996. El cebo intensivo en Ganado porcino. En: Buxadé C. *Zootecnia. Bases de producción animal. Tomo IV. Porcinicultura intensiva y extensiva.* Mundi-Prensa. Madrid. Pp 382.
- Claus R, Weiler U. 1994. Endocrine regulation of growth and metabolism in the pig: a review. *Livest Prod Sci.* 37: 245-260.
- Corino C, Musella M, Pastorelli G, Rossi R, Paolone K, Costanza L, Manchisi A, Maiorano G. 2008. Influences of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and total lysine content on growth, carcass characteristics and meat quality of heavy pigs. *Meat Sci.* 79: 307-316.
- Csapó J, Loki K, Csapó-Kiss Z, Albert C. 2005. Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying post-column derivatization. *Acta Agraria Kaposváriensis.* 9:33-51.
- Díaz I, Vilas J, Skoknic A, Luengo J. 1990. Efecto del sexo sobre la respuesta productiva y características de las canales de cerdos en crecimiento y engorda. *Agríc Téc.* 50: 113-119.
- Diestre A. 1996. La canal en el Ganado porcino: clasificación y calidad. En: Buxadé C. *Zootecnia. Bases de producción animal. Tomo IV. Porcinicultura intensiva y extensiva.* Mundi-Prensa. Madrid. Pp 382.
- [DOF] Diario Oficial de la Federación: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. 1999. Diario Oficial de la Federación, miércoles 02 de Agosto del 2001.
- Drew MD, Schafer TC, Zijlstra RT. 2012. Glycemic index of starch affects nitrogen retention in grower pigs. *J Anim Sci.* 90: 1233-1241.
- Duodu KG, Taylor JRN, Belton PS, Hamaker BR. 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J Cereal Sci.* 38: 117-131.
- Duran-Montgé P, Theil PK, Lauridsen C, Esteve-Garcia E. 2009. Dietary fat source affects metabolism of fatty acids in pigs as evaluated by altered expression of lipogenic genes in liver and adipose tissues. *Animal.* 3: 535-542.
- Elkin RG, Freed MB, Hamaker BR, Zhang Y, Parsons CM. 1996. Condensed tannins are only partially responsible for variations in nutrient digestibilities of sorghum grain cultivars. *J Agric Food Chem.* 44: 848-853.

- Emmambux NM, Taylor JRN. 2003. Sorghum kafirin interaction with various phenolic compounds. J Sci Food Agric. 83: 402- 407.
- Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Kimball SR, Jefferson LS, Davis TA. 2006. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. Am J Physiol Endocrinol Metab. 290: E612-E621.
- Fialho ET, Rodrigues PB, Lima JAF, Silva HO, Oliveira V. 2004. Performance and nutrient digestibility of low tannin sorghum fed to pigs from 10 to 30 kg. J Anim Sci. 82 (Suppl. 1): 22.
- Garcés PY. 2010. Fisiología del crecimiento y desarrollo. En: Fisiología veterinaria e introducción a la fisiología de los procesos productivos. Editores: Caballero CSC, Villa-Godoy A. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 728 .
- Gómez RS, Ángeles ML, Mejía GCA, Rentería FJA. 2008. Estrategias de alimentación y manejo del cerdo II. Publicación Técnica No. 8. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP-SAGARPA, Colón, Querétaro, México.
- Gómez SJG, Reis STC, Mariscal LG, Aguilera BA, Bernal SMG, Escobar GK. 2017. Gastrointestinal morphophysiology and presence of kafirins in ileal digesta in growing pigs fed sorghum-based diets. J Appl Anim Res. Consultado en: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/09712119.2017.1371607?needAccess=true>
- Gunawan AM, Park SK, Pleitner JM, Feliciano L, Grant AL, Gerrard. 2007. Contractile protein content reflects myosin heavy-chain isoform gene expression. J Anim Sci. 85: 1247-1256.
- Guo J, Shan T, Wu T, Zhu LN, Ren Y, An S, Wang Y. 2011. Comparisons of different muscle metabolic enzymes and muscle fiber types in Jinhua and Landrace pigs. J Anim Sci. 89: 185-191.
- Hamaker BR, Kirleis AW, Mertz ET, Axtell JD. 1986. Effect of cooking on the protein profiles and in vitro digestibility of sorghum and maize. J Agric Food Chem. 34: 647-649.
- Hamaker BR, Mohamed AA, Habben JE, Huang CP, Larkins BA. 1995. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. Cereal Chem. 72: 583-588.
- Jansman AJM, Enting H, Verstegen MWA, Huisman J. 1994. Effect of condensed tannins in hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) on the activities of trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1) in digesta collected from the small intestine of pigs. Br J Nutr. 71:627-641.
- Jansman AJM, Verstegen MWA, Huisman J. 1993. Effects of dietary inclusion of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low and high tannin content of condensed tannins on digestion and some physiological parameters in piglets. Anim Feed Sci Technol. 43: 239-257.
- Jezierny D, Mosenthin R, Bauer E. 2010. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. Anim Feed Sci Technol. 157: 111-128.
- Jezierny D, Mosenthin R, Sauer N, Roth S, Piepho HP, Rademacher M, Eklund M. 2011. Chemical composition and standardized ileal digestibilities of crude protein and amino acids in grain legumes for growing pigs. Livest Sci. 138: 229-243.

- Jiménez SH. 2010. Función testicular. En: Fisiología veterinaria e introducción a la fisiología de los procesos productivos. Editores: Caballero CSC, Villa-Godoy A. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 728 .
- Jondreville C, Van Den Broecke J, Gátel F, Grosjean F, Van Cauwenberghes S, Seve B. 2001. Ileal digestibility of amino acids and estimates of endogenous amino acid losses in pigs fed wheat, triticale, rye, barley, maize and sorghum. *Anim Res*. 50: 119-134.
- Lee SH, Shinde PL, Choi JY, Kwon IK, Lee JK, Pak SI, Cho WT, Chae BJ. 2010. Effects of tannic acid supplementation on growth performance, blood hematology, iron status and faecal microflora in weanling pigs. *Livestock Sci*. 131: 281-286.
- Liu SY, Selle PH, Aaron J, Cowieson J. 2013. Strategies to enhance the performance of pigs and poultry on sorghum-based diets. *Anim Feed Sci Technol*. 183: 175-183.
- Liu LY, Wang J, Huang Y, Pan HB, Zhang X, Huang ZX, Zhao SM, Gao SZ. 2014. The effect of dietary protein levels on the expression of genes coding for four selected protein translation initiation factors in muscle tissue of Wujin pig. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 98: 310-317.
- Mariscal LG. 2007. Conceptos básicos de alimentación de cerdos. En: Estrategias de alimentación y manejo del cerdo. Publicación Técnica No. 3. Autores: Gómez RS, Mariscal LG, Mejía GCA, Braña VD, Salazar GG. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP-SAGARPA. Colón, Querétaro, México.
- Mariscal-Landín G, Avellaneda JH, Reis STC, Aguilera BA, Borbolla GA, Mar B. 2004. Effect of tannins in sorghum on amino acid ileal digestibility and on trypsin (E.C.2.4.21.4) and chymotrypsin (E.C.2.4.21.1) activity of growing pigs. *Anim Feed Sci Technol*. 117: 245-264.
- Mariscal-Landín G, Reis DSTC, Avalos MA. 2010. Ileal amino acids digestibility of sorghum in weaned piglets and growing pigs. *Animal*. 8: 1341-1348.
- Martínez S, Campos C, Madrid J, Cerón JJ, Orengo J, Tvarijonaviciute A, Valera L, Hernández F. 2013. Conocimiento actual de las hormonas reguladoras de la ingestión de alimentos en la especie porcina. *An Vet (Murcia)*. 29: 7-22.
- [NRC] Nutrient requirements of swine. 2012. 11 ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Oria MP, Hamaker BR, Axtell JD, Huang C-P. 2000. A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. *Proc Natl Acad Sci*. 97:5065-5070.
- Oria MP, Hamaker BR, Shull JM. 1995. Resistance of sorghum  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -kafirins to pepsin digestion. *J Agric Food Chem*. 43:2148-2153.
- Park SK, Gunawan AM, Scheffler TL, Grant AL, Gerrard DE. 2009. Myosin heavy chain isoform content and energy metabolism can be uncoupled in pig skeletal muscle. *J Anim Sci*. 87: 522-531.
- Piluzza G, Sulas L, Bullitta. 2013. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass Forage Sci*. 69: 32-48.
- Price, M. L., S. Van Scoyoc, L. G. Butler. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem*. 26:1214-1218.



- Reyes SE, Cortéz CA, Morales BE, Ávila GE. 2000. Adición de DL-metionina en dietas con sorgo alto en taninos para pollos de engorda. Tec Pecu Mex. 38: 1-8.
- Rooyackers OE, Nair KS. 1997. Hormonal regulation of human muscle protein metabolismo. Annu Rev Nutr. 17: 457-485.
- Salinas I, Pró A, Salinas Y, Sosa E, Becerril CM, Cuca M, Cervantes M, Gallegos J. 2006. Compositional variation amongst sorghum hybrids: effects of kafirin concentration on metabolizable energy. J Cereal Sci. 44: 342-346.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning a laboratory manual. Volume 3. 3rd ed. New York, USA: CSHL Press. Appendix 9, Detection systems; p. A9.28.
- Santana VALJ. 2008. Medición del espesor de grasa dorsal y área del ojo del lomo en canales de jabalí (*Sus scrofa* L): su relación con la cantidad de grasa y músculo. Tesis. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía.
- SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT® 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. SAS. 2008.
- Sato K. 2016. Molecular nutrition: interaction of nutrients, gene regulations and performances. Animal Sci J. 87: 857-862.
- Schinckel AP, Lange CFM. 1996. Characterization of growth parameters needed as inputs for pig growth models. J Anim Sci. 74: 2021-2036.
- Schinckel AP, Li N, Richert BT, Preckel PV, Einstein ME. 2003. Development of a model to describe the compositional growth and dietary lysine requirements of pigs fed ractopamine. J Anim Sci. 81: 1106-1119.
- Selle PH, Cadogan DJ, Li X, Bryden WL. 2010. Implications of sorghum in broiler chicken nutrition. Anim Feed Sci Technol. 156: 57-74.
- Serrano J, Puupponen-Pimia R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F. 2009. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. Mol Nutr Food Res. 53: 310-329.
- Shimada MA, Rentería FJA. 2010. Mecanismos que regulan el consume voluntario de alimento y de agua. En: Fisiología veterinaria e introducción a la fisiología de los procesos productivos. Editores: Caballero CSC, Villa-Godoy A. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 728 .
- Singer AJ, Quinn JV, Hollander JE. 2008. The cyanoacrylate topical skin adhesives. Am J Emerg Med. 26: 490-496.
- Solanes FX, Grandinson K, Rydhmer L, Stern S, Andersson K, Lundeheim N. 2004. Direct and maternal influences on the early growth, fattening performance, and carcass traits of pigs. Livest Prod Sci. 88: 199-212.
- Srinivasa RP, Ganesh KC. 2013. Characterization of improved sweet sorghum cultivars. Springer briefs in agriculture. Srinivasa RP, Ganesh KC (editors). Springer. 127 pp.
- Suryawan A, Jeyapalan AS, Orellana RA, Wilson FA, Nguyen HV, Davis TA. 2008. Leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs by enhancing mTORC1 activation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 295: E868-E875.
- Swindle MM. 1998. Surgery, anesthesia, and experimental techniques in swine. Iowa State University Press.

- Taylor J, Bean SR, Ioerger BP, Taylor JRN. 2007. Preferential binding of sorghum tannins with  $\gamma$ -kafirin and the influence of tannin binding on kafirina digestibility and biodegradation. J. Cereal Sci. 46: 22-31.
- van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci. 74:3583-3597.
- Vitti DMSS, Abdalla AL, Bueno ICS, Silva FJC, Costa C, Bueno MS, Nozella EF, Longo C, Vieira EQ, Cabral FSLC, Godoy PB, Mueller-Harvey I. 2005. Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. Animal Feed Sci Technol. 119: 345-361.
- Wong JH, Lau T, Cai N, Singh J, Pedersen JF, Vensel WH, Hurkman WJ, Wilson JD, Lemaux PG, Buchanan BB. 2009. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. J Cereal Sci. 49: 73-82.
- Wood JD, Riley JE. 1982. Comparison of boars and castrates for bacon production. I. Growth data, and carcass and joint dissection. Anim Prod. 35: 55-63.

**Cuadro 1. Composición química del maíz y sorgos dietarios**

	Maíz	Sorgos			
		BTBK	BTAK	ATBK	ATAK
Proteína cruda, %	5.8	8.9	9.08	9.81	10.54
Kafirinas verdaderas <sup>1</sup>	-	42.50	51.10	45.00	57.00
Taninos, %	-	0.03	0.01	6.36	6.88
Energía neta, Mcal/kg	4346.66	4191.80	4237.10	4385.50	4302.00
Cenizas, %	1.16	1.49	1.88	2.07	2.08
Fibra detergente neutra, %	9.40	9.21	9.65	15.24	15.10
Extracto etéreo, %	3.60	3.20	4.43	3.94	3.51
Aminoácidos, g/kg de materia seca					
Alanina	3.9	7.3	6.8	8.4	9.0
Arginina	3.2	3.2	3.3	4.0	4.9
Ácido aspártico	4.6	5.6	6.2	7.4	5.3
Cisteína	1.9	2.0	2.0	2.1	2.1
Ácido glutámico	11.1	18.5	15.2	19.1	20.6
Glicina	2.3	2.1	2.7	3.0	3.0
Histidina	1.9	2.0	1.8	2.0	2.1
Isoleucina	2.6	3.8	3.9	4.3	4.1
Leucina	5.0	10.1	10.2	10.6	11.5
Lisina	2.1	1.9	2.1	1.8	2.2
Metionina	2.2	2.0	1.3	1.3	1.3
Prolina	4.3	7.0	7.5	7.2	8.4
Fenilalanina	2.4	3.6	3.7	4.7	4.9
Serina	2.4	3.4	3.7	4.0	4.2
Treonina	2.4	2.3	3.1	3.1	2.7
Tirosina	1.9	2.7	2.4	2.7	3.2
Valina	4.0	4.3	4.3	5.0	5.2

<sup>1</sup>Expresadas como porcentaje del contenido de prolaminas respecto al porcentaje de proteína cruda

**Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales<sup>1</sup>**

Ingredientes	Dietas				
	C	BT-BK	BT-AK	AT-BK	AT-AK
<b>Fase de crecimiento</b>					
Maíz	634.2				
Sorgo LTLK		641.5			
Sorgo LTHK			641.5		
Sorgo HTLK				631.0	
Sorgo HTHK					631.0
Pasta de soya	317.3	311.2	311.2	321.5	321.5
Aceite de canola	24.6	23.2	23.2	23.5	23.5
Sal común	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Carbonato de calcio	6.1	6.3	6.3	6.2	6.2
Fosfato dicálcico	9.2	9.4	9.4	9.3	9.3
Minerales <sup>2</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitaminas <sup>3</sup>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
<b>Fase de finalización</b>					
Maíz	704.2				
Sorgo LTLK		707.4			
Sorgo LTHK			707.4		
Sorgo HTLK				695.8	
Sorgo HTHK					695.8
Pasta de soya	252.3	250.3	250.3	261.7	261.7
Aceite de canola	21.4	20.0	20.0	20.2	20.2
Sal común	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Carbonato de calcio	5.6	5.7	5.7	5.7	5.7
Fosfato dicálcico	8.0	8.2	8.2	8.1	8.1
Minerales <sup>2</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitaminas <sup>3</sup>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

<sup>1</sup>Expresado como g/kg. <sup>2</sup>Cada kg de producto contiene: sulfuro 0.02 %, cobalto 0.72 mg, cobre 14.4 mg, hierro 120 mg, manganeso 36 mg, selenio 0.30 mg, yodo 0.96 mg, zinc 144 mg, cloro 0.03%. <sup>3</sup>Cada kg de producto contiene: vitamina A 10.20 unidades internacionales (UI), vitamina D 1.98 UI, vitamina E 0.06 UI, vitamina K 1.20 mg, riboflavina (B2) 7.20 mg, vitamina B12 (cianocobalamina) 0.04 mg, colina 968.58 mg, niacina 36 mg, ácido pantoténico 16.55 mg, tiamina (B1) 0.30 mg, piridoxina (B6) 0.31 mg, biotina 0.08 mg, ácido fólico 0.75 mg.

**Cuadro 3. Parámetros productivos**

		CDA	GDP	EA	PF
Etapa o fase	Crecimiento	2.7020 <sup>b</sup>	0.9133 <sup>b</sup>	0.3392 <sup>a</sup>	79.8136 <sup>b</sup>
	Finalización	3.4022 <sup>a</sup>	0.9598 <sup>a</sup>	0.2829 <sup>b</sup>	103.81 <sup>a</sup>
Dieta	C	3.0572 <sup>ab</sup>	0.9665	0.3196	92.7826
	LT-LK	3.0518 <sup>ab</sup>	0.9252	0.3090	91.7279
	LT-HK	3.1346 <sup>a</sup>	0.9410	0.3055	92.3677
	HT-LK	3.0416 <sup>ab</sup>	0.9425	0.3134	91.3249
	HT-HK	2.9753 <sup>b</sup>	0.9077	0.3076	90.8515
Sexo	Macho	3.2287 <sup>a</sup>	0.9622 <sup>a</sup>	0.3016 <sup>b</sup>	92.9647 <sup>a</sup>
	Hembra	2.8755 <sup>b</sup>	0.9110 <sup>b</sup>	0.3204 <sup>a</sup>	90.6571 <sup>b</sup>
Sorgo (Taninos)	Bajo taninos	3.0932 <sup>a</sup>	0.9331	0.3072	92.0478
	Alto taninos	3.0084 <sup>b</sup>	0.9251	0.3105	91.0882
Sorgo (Kafirinas)	Baja kafirinas	3.0467	0.9338	0.3112	91.5264
	Alta kafirinas	3.0549	0.9243	0.3065	91.6096
EEM		0.0192	0.0090	0.0030	0.8160
<i>P</i>					
Fase		<0.0001	0.0071	<0.0001	<0.0001
Dieta		0.0489	0.2610	0.4904	0.1907
Sexo		<0.0001	0.0038	0.0010	0.0001
Fase*Dieta		0.1814	0.0340	0.1124	0.5085
Fase*Sexo		0.5177	0.3909	0.9056	0.4690
Sexo*Dieta		0.3819	0.8366	0.4376	0.8219
Fase*Dieta*Sexo		0.6501	0.2181	0.5863	0.8221
Cereal		0.8800	0.0892	0.1243	0.0950
Taninos		0.0216	0.6635	0.5722	0.1202
Kafirinas		0.8181	0.6074	0.4311	0.8915
Taninos*Kafirinas		0.0424	0.1756	0.8431	0.3642

CDA: consumo diario de alimento, kg/d. GDP: ganancia diaria de peso, kg/d. EA: eficiencia alimenticia, kg de peso vivo ganados/kg alimento consumido. PF: peso final del experimento, kg. EEM: error estándar de la media. <sup>ab</sup> letras diferentes en la misma columna para el mismo parámetro indican diferencias estadísticas.

**Cuadro 4. Expresión de los genes eIF2B1 y eIF4e**

		$\Delta Ct$	
		eIF2B1	eIF4e
Fase	Crecimiento	0.5266	-0.9574 <sup>a</sup>
	Finalización	0.4515	-0.4910 <sup>b</sup>
Dieta	C	0.6013	-0.4766
	BT-BK	0.3302	-0.6357
	BT-AK	0.5382	-0.7708
	AT-BK	0.6950	-0.8158
	AT-AK	0.2804	-0.9221
Sexo	Macho	0.3596	-0.6873
	Hembra	0.6184	-0.7701
Sorgo (Taninos)	Bajo taninos	0.4342	-0.7032
	Alto taninos	0.4877	-0.8689
Sorgo (Kafirinas)	Baja kafirinas	0.5126	-0.7257
	Alta kafirinas	0.4093	-0.8464
EEM		0.0649	0.0606
<i>P</i>			
Fase		0.6142	0.0258
Dieta		0.3491	0.6968
Sexo		0.0956	0.6421
Fase*Dieta		0.0144	0.7190
Fase*Sexo		0.2934	0.0679
Sexo*Dieta		0.0378	0.5230
Fase*Dieta*Sexo		0.1647	0.9419
Cereal		0.5180	0.2514
Taninos		0.7426	0.4416
Kafirinas		0.5681	0.5915
Taninos*Kafirinas		0.0812	0.9472

EEM: error estándar de la media. ab letras diferentes en la misma columna para el mismo parámetro indican diferencias estadísticas.