



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DEL PERFIL DE LAS PÉRDIDAS ENDÓGENAS ILEALES DE PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS INDUCIDOS POR LA DIETA Y SU RELACIÓN CON EL PERFIL METABÓLICO EN CERDOS EN CRECIMIENTO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

IRIS ELISA AVILA ARRES

TUTOR

GERARDO MARISCAL LANDÍN

INIFAP- Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

COMITÉ TUTORAL

TERCIA CESARÍA REIS DE SOUZA

Universidad Autónoma de Querétaro

SERGIO GÓMEZ ROSALES

INIFAP- Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA AVAL

**Universidad Nacional Autónoma de México
Secretaría General
Coordinación General de Estudios de Posgrado**

**Yazmín Alcalá Canto
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL
Presente**

Quien suscribe, Dr. Gerardo Mariscal Landín, tutor(a) principal de Iris Elisa Ávila Arres con número de cuenta 304055733, integrante del alumnado de Doctorado en CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL, manifiesto bajo protesta de decir verdad haber leído, revisado y corregido el manuscrito, del trabajo escrito de graduación elaborado por dicha persona, cuyo título es: "CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DEL PERFIL DE LAS PÉRDIDAS ENDÓGENAS ILEALES DE PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS INDUCIDOS POR LA DIETA Y SU RELACIÓN CON EL PERFIL METABÓLICO PLASMÁTICO EN CERDOS EN CRECIMIENTO" y que cumple con los requisitos para optar el grado de doctorado. Asimismo, conozco el reporte que contiene el resultado emitido por la herramienta tecnológica de identificación de coincidencias y similitudes con la que se analizó ese trabajo, para la prevención de faltas de integridad académica.

De esta manera, con fundamento en lo previsto por los artículos 96, fracción III del Estatuto General de la UNAM; 21, primero y segundo párrafos, 32, 33 y 34 del Reglamento General de Exámenes y; 22, 49, primer párrafo y 52, fracción II del Reglamento General de Estudios de Posgrado, **AVALO** que el trabajo de graduación presentado se envíe al jurado para su revisión y emisión de votos, por considerar que cumple con las exigencias de rigurosidad académica previstas en la legislación universitaria.

Protesto lo necesario,

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 4 de diciembre de 2024
Dr. Gerardo Mariscal Landín
Tutor principal



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Caracterización proteómica del perfil de las pérdidas endógenas ileales de proteína y aminoácidos inducidos por la dieta y su relación con el perfil metabólico plasmático en cerdos en crecimiento

que presenté para obtener el grado de ----**Doctorado** es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

IRIS ELISA AVILA ARRES

304055733

DEDICATORIAS

A Ana Isabel, que llena mis días de luz y me enseña a valorar las pequeñas alegrías de la vida.

A mi compañero de vida, Pepe, que me inspira a crecer, a seguir mis pasiones y a encontrar fortaleza en cada desafío. Gracias por tu apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, gracias por cuidar amorosamente a mi familia durante mi ausencia. Sin tu apoyo, nada de esto hubiera sido posible.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Gerardo Mariscal por su apoyo incondicional y por la confianza que depositó en mí para llevar a cabo este trabajo. Su guía ha sido esencial en mi formación académica.

A la Dra. Elba Rodríguez, gracias por compartir sus conocimientos y por introducirme en el campo de la proteómica. Aprecio profundamente su tiempo y su paciencia.

Al Dr. Renteria (QEPD), al Dr. Gerardo, a Carlos, Erick y al personal que colaboró en la toma de muestras, en la realización de las cirugías y en el análisis de las muestras.

A la Dra. Tercia y al Dr. Sergio, les agradezco sus valiosos comentarios y sugerencias, los cuales fueron fundamentales para enriquecer la calidad de este trabajo.

Finalmente, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, al CENID Fisiología y Mejoramiento Animal del INIFAP y al CONACYT por proporcionar los recursos académicos y financieros que han sido fundamentales para mi desarrollo profesional.

RESUMEN

La digestibilidad ileal estandarizada (DIE) de los aminoácidos requiere la cuantificación de las pérdidas endógenas basales (PEB) de aminoácidos en el íleon terminal. Las dietas libres de nitrógeno (DLN) son el método más utilizado para determinarlas. Sin embargo, este método puede provocar cambios metabólicos que podrían afectar las estimaciones de las PEB y que son difíciles de explicar. Este estudio evaluó el efecto metabólico de la dieta en las PEB en cerdos alimentados con DLN y dietas con caseína (DCAS). Además, se utilizó un enfoque proteómico para identificar los cambios en las proteínas presentes en la digesta. Los resultados mostraron un aumento en la albúmina plasmática en los cerdos alimentados con DCAS ($P < 0.05$), mientras que la creatinina y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) aumentaron en los cerdos alimentados con DLN ($P < 0.03$). No se observaron diferencias significativas en otros metabolitos. Las PEB de proteína en la digesta ileal fueron similares entre los tratamientos. Sin embargo, en los cerdos alimentados con DCAS, las PEB de ácido glutámico, ácido aspártico, serina, glicina, histidina, treonina, alanina, tirosina, valina ($P < 0.05$) e isoleucina ($P = 0.06$) se incrementaron significativamente. El análisis proteómico identificó 348 proteínas relacionadas con las funciones metabólicas del intestino, de las cuales 101 fueron diferencialmente abundantes (PDA) entre los tratamientos ($P < 0.05$). Las PDA evidenciaron que las DLN incrementan la inflamación intestinal, la respuesta inmune, la autofagia y el recambio celular. Además, se reduce la síntesis de secreciones pancreáticas e intestinales. En conclusión, las DLN conducen a un balance negativo de proteína que afecta las estimaciones de las PEB de aminoácidos ileales, por lo que es esencial considerar el efecto de la dieta en el estado metabólico. En este sentido, las dietas con proteína altamente digestible, como caseína, son más apropiadas para la determinación de las PEB de proteína y aminoácidos.

Palabras clave: cerdos, digestibilidad ileal, pérdidas endógenas basales, metabolitos plasmáticos, proteómica.

ABSTRACT

Standardized ileal digestibility (SID) of amino acids requires quantifying basal endogenous losses (BEL) of amino acids in the terminal ileum. Nitrogen-free diets (NFD) are the most commonly used method to determine them. However, this method may induce metabolic changes that could affect BEL estimations and are difficult to explain. This study evaluated the metabolic effect of diet on BEL in pigs fed NFD and casein diets (CAS). Additionally, a proteomic approach was used to identify changes in the proteins present in the digesta. The results showed an increase in plasma albumin in pigs fed CAS ($P < 0.05$), while creatinine and low-density lipoproteins (LDL) increased in pigs fed NFD ($P < 0.03$). No significant differences were observed in other metabolites. The BEL of protein in the ileal digesta were similar between treatments. However, in pigs fed CAS, the BEL of glutamic acid, aspartic acid, serine, glycine, histidine, threonine, alanine, tyrosine, valine ($P < 0.05$), and isoleucine ($P = 0.06$) significantly increased. The proteomic analysis identified 348 proteins related to intestinal metabolic functions, of which 101 were differentially abundant (PDA) between treatments ($P < 0.05$). The PDA indicated that NFD increases intestinal inflammation, immune response, autophagy, and cell turnover while reducing the synthesis of pancreatic and intestinal secretions. In conclusion, NFD leads to a negative protein balance that affects the estimates of amino acids BEL, making it essential to consider the effect of diet on metabolic status. In this context, diets with highly digestible protein, such as casein, are more appropriate for determining BEL of protein and amino acids.

Keywords: pigs, ileal digestibility, basal endogenous losses, plasma metabolites, proteomics.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
CONTENIDO.....	iii
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	3
2.1. Digestibilidad ileal de aminoácidos y pérdidas endógenas ileales de aminoácidos	3
2.2. Secreciones endógenas del tracto gastrointestinal	5
2.3. Absorción de nitrógeno endógeno.....	11
2.4. Determinación de las pérdidas endógenas basales de proteína y aminoácidos	14
2.4.1. Dietas libres de nitrógeno	15
2.4.2. Dietas con proteína altamente digestible	18
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPOTESIS	22
5. OBJETIVOS	22
6. METODOLOGÍA.....	22
7. ARTÍCULO 1	23
8. ARTÍCULO 2.....	32
9. DISCUSIÓN GENERAL	48
10. CONCLUSIONES.....	51
11. REFERENCIAS	52

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Secreciones de nitrógeno endógeno en el tracto superior de cerdos en crecimiento.

Cuadro 2. Perfil de aminoácidos (porcentaje molar) de las secreciones endógenas del tracto gastrointestinal y bacterias intestinales.

Cuadro 3. Diferencias en el perfil de aminoácidos de las pérdidas endógenas determinadas por diferentes métodos.

Figura 1. Flujo total de aminoácidos en el íleon distal y su relación con el contenido de los ingredientes de la dieta.

1. INTRODUCCIÓN

La producción porcina es una de las industrias más importantes para satisfacer las necesidades de carne para la alimentación humana (Shurson y Kerr, 2023). El costo del alimento representa dos tercios del costo de producción en cerdos de engorda. Por lo tanto, las estrategias dirigidas a incrementar la eficiencia en el uso de los nutrientes del alimento y reducir su excreción son necesarias para satisfacer la creciente demanda de carne de cerdo. Después de la energía, la proteína es el componente de mayor costo en las dietas de los cerdos (Yang et al., 2023). La precisión en el aporte de proteína en la dieta de los cerdos no solo optimiza el crecimiento y la salud de los animales, sino que también representa una mejora significativa en la energía disponible debido a la disminución de las pérdidas energéticas relacionadas con la desaminación de las proteínas (Shurson y Kerr, 2023). Una de las estrategias utilizadas para mejorar la eficiencia en la utilización de proteína es la formulación de las dietas de los cerdos basada en los valores de digestibilidad ileal estandarizada de los aminoácidos de los ingredientes de las dietas. Los valores de digestibilidad ileal estandarizada se obtienen ajustando los valores de digestibilidad ileal aparente por las pérdidas endógenas basales de aminoácidos. Las pérdidas endógenas basales de aminoácidos son pérdidas inevitables de proteína y aminoácidos relacionadas con el funcionamiento del tracto gastrointestinal. La cuantificación precisa de las pérdidas endógenas basales de aminoácidos es importante para determinar los requerimientos de proteína, ya que contribuyen a los costos metabólicos asociados con la síntesis de proteínas y el recambio del del tracto gastrointestinal.

La estimación de las pérdidas endógenas basales a través de dietas libres de nitrógeno es el método más ampliamente utilizado (Kong y Adeola, 2014). Sin embargo, la alimentación con dietas libres de nitrógeno puede conducir a anomalías fisiológicas y metabólicas que pueden afectar las determinaciones de las pérdidas endógenas basales, lo cual ha sido la principal crítica a este método (Jansman et al., 2002). Por esta razón, se sugiere el uso de dietas con proteínas altamente purificadas y digeribles para minimizar estos efectos (Adedokun et al., 2007). No obstante, estas metodologías no proporcionan información sobre la fuente del nitrógeno endógeno en el flujo ileal; solo determinan qué aminoácido o fracción en particular es o no de origen endógeno, lo que complica la explicación de las inconsistencias encontradas entre los aminoácidos de la digesta (Cowieson et al., 2017).

Con el desarrollo de la biotecnología, la proteómica ha sido ampliamente utilizada para identificar los cambios en respuesta a alteraciones fisiológicas, patológicas y nutricionales (Wang et al., 2006; Almeida et al., 2014; Li et al., 2017). Por lo tanto, uno de los objetivos de este estudio es utilizar análisis proteómicos y bioinformáticos para identificar el efecto de la dieta en las secreciones intestinales y probar la hipótesis de que la alimentación libre de nitrógeno modifica el estado metabólico afectando las secreciones de proteína y aminoácidos.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Digestibilidad ileal de aminoácidos y pérdidas endógenas ileales de aminoácidos

El contenido de aminoácidos de las proteínas de las dietas de los cerdos no refleja la cantidad de aminoácidos disponibles. La disponibilidad de los aminoácidos se refiere a la cantidad que es digerida, absorbida y que está disponible para el metabolismo o la síntesis de proteína (Sibbald, 1987). La digestibilidad es una medida indirecta del grado de digestión de la proteína en aminoácidos dentro del tracto gastro intestinal para su posterior absorción (Deglaire y Moughan, 2012) y representa la mayor fuente de variación en la disponibilidad de los aminoácidos suministrados en la dieta (Fuller, 2012). Por lo tanto, la digestibilidad es un factor importante para evaluar la calidad nutricional de los ingredientes de la dieta.

La digestibilidad puede determinarse a nivel ileal o fecal. Sin embargo, la digestibilidad ileal es más adecuada debido a que el intestino delgado es el principal sitio de absorción de aminoácidos. Además, la alta actividad metabólica de las bacterias del intestino grueso podría alterar el perfil de los aminoácidos no digeridos de la dieta, lo que puede conducir a una subestimación o sobreestimación en la digestibilidad aminoácidos (Adeola et al., 2016).

La digestibilidad ileal de proteína y aminoácidos de los ingredientes de la dieta se calcula indirectamente mediante la diferencia entre la cantidad de proteína y aminoácidos suministrados en la dieta y la cantidad recuperada en la digesta a nivel del íleon distal (Stein et al., 2007a). La digesta colectada del íleon terminal contiene aminoácidos de la dieta no absorbidos y aminoácidos de origen endógeno que son sintetizados y secretados al lumen intestinal y no reabsorbidos durante el proceso digestivo, contribuyendo así al flujo total de aminoácidos en la digesta ileal (Ravindran, 2016; Aderibigbe et al., 2021). Estos aminoácidos endógenos en el flujo ileal se conocen como pérdidas endógenas ileales de aminoácidos (Stein et al., 2007a).

Las pérdidas endógenas ileales de aminoácidos se dividen en dos componentes principales: una fracción basal y una específica (Ravindran, 2021). Las pérdidas endógenas basales son las pérdidas inevitables de proteínas y aminoácidos asociados a las funciones metabólicas relacionadas con el flujo físico de materia seca del alimento a través del tracto gastrointestinal del animal y representan las pérdidas mínimas esperadas bajo cualquier situación de alimentación, por lo que son consideradas independientes de la composición

de la dieta y, por lo tanto, permanecen constantes. Mientras que las pérdidas endógenas específicas se incrementan en función de los componentes específicos de la dieta. Por lo tanto, los aminoácidos colectados en la digesta ileal provienen de aminoácidos de la dieta no digeridos, aminoácidos endógenos basales y aminoácidos endógenos específicos (**Figura 1**).

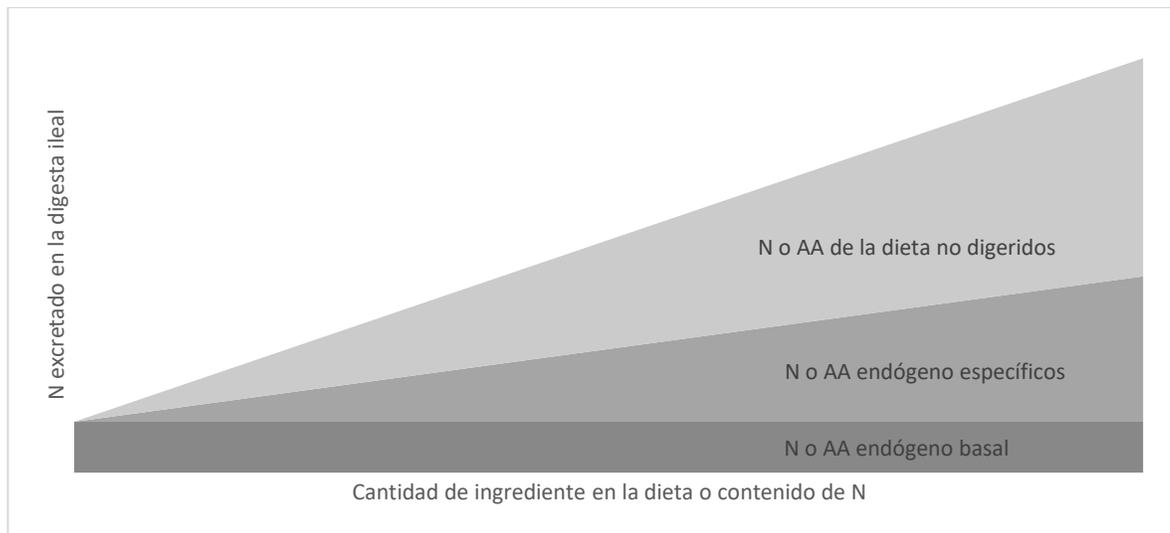


Figura 1. Flujo total de aminoácidos en el íleon distal y su relación con el contenido de los ingredientes de la dieta (Adeola et al., 2016).

La digestibilidad ileal es expresada como aparente (DIA), estandarizada (DIE) o verdadera (DIV), dependiendo de las pérdidas de aminoácidos endógenos que sean considerados en las determinaciones de digestibilidad ileal. La digestibilidad ileal aparente (DIA) de los aminoácidos es calculada por diferencia entre la cantidad de aminoácidos ingeridos en la dieta y la cantidad de aminoácidos recuperados en la digesta en el íleon terminal, sin considerar la contribución de los aminoácidos de origen endógeno presentes en el flujo ileal. Por lo tanto, los valores de DIA aumentan curvilíneamente con el aumento de proteína y/o aminoácidos en la dieta debido a la contribución relativa de los aminoácidos endógenos al total excretado, contribución que disminuye con el incremento en el consumo de aminoácidos (Fan et al., 1994). Por lo tanto, los valores de DIA subestiman la digestibilidad de los aminoácidos, especialmente la de los ingredientes bajos en proteína, como los cereales (Xue et al., 2014). Formular las dietas en base a los valores de DIA puede resultar

en dietas con alto contenido de proteína y aminoácidos y, consecuentemente, en elevado costo de las dietas (Cowieson et al., 2019).

La digestibilidad ileal ajustada por las pérdidas endógenas totales (basales y específicas) de aminoácidos se denomina digestibilidad ileal verdadera (DIV). La DIV representa la porción de aminoácidos exclusivamente de la dieta que desaparecen en el intestino antes de llegar al íleon terminal. Las pérdidas endógenas totales de aminoácidos se estiman mediante el método de la homoarginina o el uso de isotopos marcados (Nyachoti et al., 1997a). Sin embargo, estos métodos son costosos y requieren de equipo especializado, por lo que hay poca información disponible sobre la DIV de los ingredientes de las dietas y rara vez se utilizan (Stein et al., 2007b).

Por lo tanto, se considera que el uso de los valores de digestibilidad ileal estandarizada (DIE) de los aminoácidos de los ingredientes de las dietas es el más adecuado para la formulación de las dietas de los cerdos (Stein et al., 2007b). Los valores de digestibilidad ileal estandarizada (DIE) se obtienen cuando los valores de DIA son corregidos por las pérdidas endógenas basales de aminoácidos (Stein et al., 2007a; Ravindran, 2021). Este ajuste permite la aditividad en las dietas mixtas, es decir, la cantidad de los nutrientes digestibles en el alimento es igual a la suma de los nutrientes digestibles de cada ingrediente de la dieta, ya que los valores de DIE son independientes de las pérdidas endógenas basales de aminoácidos y del contenido de aminoácidos en la dieta (Xue et al., 2014). Además, los valores de DIE contemplan el efecto que los componentes específicos de los ingredientes de la dieta inducen en la secreción de aminoácidos endógenos, ya que solo las pérdidas endógenas basales de aminoácidos han sido sustraídas del flujo de aminoácidos ileales. Estas características —la aditividad y representar el efecto de los componentes específicos de la dieta— son fundamentales para la formulación precisa de alimentos de menor costo (Xue et al., 2014).

2.2. Secreciones endógenas del tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal secreta continuamente proteínas sintetizadas endógenamente hacia el lumen intestinal para la digestión y absorción de los componentes de la dieta, así como para funciones de defensa inmune en el intestino. Se estima que hasta 1g de proteína endógena es secretada al intestino por cada 2g de proteína ingerida en la dieta, y que cerca del 47-74% del nitrógeno en el flujo ileal es de origen endógeno (Cowieson et al., 2017).

Las fuentes principales de nitrógeno endógeno son la saliva, las secreciones gástricas, pancreáticas e intestinales, la bilis, las mucoproteínas, las descamaciones de células epiteliales del intestino, las proteínas plasmáticas (albumina, inmunoglobulinas) y algunas fuentes de nitrógeno no proteico (amidas) (**Cuadro. 1**).

Cuadro 1. Secreciones de nitrógeno endógeno en el tracto superior de cerdos en crecimiento.

Fuente de N endógeno	Secreción de N, g/d	Secreción de N, %
Saliva y secreciones gástricas	0.3-3.1	4-8
Páncreas	1.8-3.0	7-23
Secreción biliar	1.5-2.5	6-19
Moco, enzimas digestivas y descamaciones epiteliales	4.3-32.1	54-79
Secreción endógena total	7.9-40.2	100

(Nyachoti et al., 1997b; Starck et al., 2018)

La cantidad de secreciones de proteínas endógenas refleja el nivel de actividad metabólica en el intestino. En cerdos en crecimiento, entre 16 y 33 gramos de nitrógeno endógeno ingresan diariamente al tracto gastrointestinal (Nyachoti et al., 1997b). Sin embargo, esta cantidad no es constante y puede ser afectada por diversos factores como el consumo de alimento, la composición de la dieta, la tasa de recambio de mucina, el peso corporal y la edad del animal, el estado de salud del intestino, la secreción de enzimas digestivas, el estímulo ambiental y bacteriano (Moter y Stein, 2004; Piel et al., 2005; Mariscal-Landín y Reis de Souza, 2006; Pahm et al., 2008).

Las secreciones endógenas del tracto gastrointestinal inician con la digestión del alimento en la boca, donde las glándulas salivales secretan saliva que ayuda en la masticación, a mantener la integridad de la mucosa del tracto superior, a percibir los sabores y a controlar los microorganismos (Lamy y Mau, 2012). En cerdos, la mayor parte de la secreción de saliva proviene de las glándulas parótidas, mientras que las glándulas submandibular y sublingual contribuyen principalmente con mucinas y sustancias provenientes del plasma

sanguíneo (Gutierrez et al., 2014). La saliva está compuesta principalmente por agua (99%), electrolitos (sodio, potasio, cloro y bicarbonato), hormonas, ácidos nucleicos y una gran variedad de proteínas y péptidos (Schipper et al., 2007). A través de análisis proteómicos, en lechones de 21 días de edad se han identificado más de 120 proteínas secretadas por las glándulas salivales (Prims et al., 2019). Dentro de las proteínas identificadas con mayor abundancia relativa en las glándulas parótidas se encuentran las proteínas ricas en prolina, carboxílico éster hidrolasa, antígeno MHC clase II, anhidrasa carbónica, alfa-amilasa, metilcitosina dioxigenasa TET2 y lipocalina salival, proteínas fijadoras de olores, sincoilina, feromaxina C en las glándulas mandibulares y sublinguales. El 85.3% de las proteínas identificadas están involucradas en procesos catalíticos y de unión. Sin embargo, la composición y la contribución de cada glándula cambia con la edad, el sexo, la alimentación y las condiciones fisiológicas del animal (Lamy y Mau, 2012).

Una vez que el alimento llega al estómago, las células secretoras de la mucosa del estómago, situadas en su mayoría en las fosas gástricas, secretan jugo parietal (células oxínticas), moco (células columnares) y pepsinógeno (células principales) (Isackson y Ashley, 2014) que ayudan a convertir el alimento que llega al estómago a un quimo semi líquido, destruyen las bacterias ingeridas con el alimento y llevan a cabo cierta hidrólisis de almidones (Fry, 2009). El pepsinógeno es una proteína de 42.4 kDa precursora de pepsina y existe en dos isoformas: pepsinógeno I y II. Se almacenan como precursores inactivos para prevenir la autodigestión de la mucosa del estómago. La pepsina I (35kDa) se forma a través de la hidrólisis del pepsinógeno I dependiente de ácido y es responsable de degradar alrededor del 20% de las proteínas ingeridas (Quintana-Hayashi et al., 2018). Además, las células parietales secretan el factor intrínseco, que es una glicoproteína que forma complejos con la vitamina B12 para facilitar su absorción en el íleon. El estómago también secreta gastrina e histamina, importantes en la regulación del ácido (Fry, 2009). El quimo que sale del estómago ingresa al intestino delgado, donde ocurre la mayor parte de la digestión y donde los nutrientes son absorbidos. El intestino delgado, la porción más extensa del tracto gastrointestinal, está unida al estómago por el píloro y al colon por la válvula ileocecal. Se divide en tres segmentos; duodeno, yeyuno e íleon, siendo el duodeno el sitio principal de secreciones. El jugo pancreático y la bilis fluyen a través de la papila duodenal para ingresar al duodeno. Al ingresar el quimo al duodeno, se estimula la liberación pancreática de un fluido alcalino con una alta concentración de bicarbonato,

protegiendo a la mucosa duodenal de los jugos gástricos ácidos y estableciendo un pH óptimo para la actividad enzimática (Sensoy, 2021). Además, el páncreas secreta enzimas proteolíticas (tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa A y B), glicosidasas (α -amilasa) y lipolíticas (lipasa pancreática, carboxilester hidrolasa y fosfolipasa A₂, colipasa) que ayudan a la digestión del alimento (Ahn et al., 2014).

Se estima que la secreción pancreática representa entre el 7 y el 23% de las secreciones endógenas de nitrógeno encontradas en el lumen intestinal. Esta variación está influenciada por la edad y el tipo de dieta (Ahn et al., 2014). En cerdos adultos, las enzimas digestivas como el precursor de la alfa-amilasa pancreática, el precursor de tripsina, triacilglicerol lipasa, el precursor de la proteína disulfuro isomerasa, el precursor de la endoplasmina y la glicina amidinotransferasa, constituyen la mayoría de las proteínas con un incremento en su expresión (Ahn et al., 2014). La mayoría de las proteínas identificadas en el acino pancreático están involucradas en procesos metabólicos y celulares necesarios para respaldar la alta producción de enzimas digestivas y el fenotipo secretor de la célula acinar pancreática. Dentro del metabolismo, el 26% de las proteínas identificadas pertenecen al metabolismo de carbohidratos, el 24% al metabolismo de aminoácidos y el 10% al metabolismo de lípidos, mientras que el 32% de las proteínas pertenecen a procesos celulares relacionados con la traducción de proteínas, plegamiento y degradación, y 8% al metabolismo energético celular (Lugea et al., 2017).

En el duodeno también se secreta la bilis producida por los hepatocitos del hígado y almacenada en la vesícula biliar. Entre el 6-19% de las secreciones endógenas de nitrógeno en el lumen intestinal en cerdos en crecimiento provienen de la vesícula biliar. La bilis ayuda a emulsificar las grasas, reduciendo la tensión superficial entre la interface agua-aceite, lo que permite la acción de la lipasa pancreática y la formación de micelas necesarias para la absorción (Tancharoenrat et al., 2022). La bilis está compuesta principalmente por agua (81-88%), electrolitos, sales biliares, grasas neutras como colesterol, glicéridos y fosfolípidos (lecitina), pigmentos biliares, minerales, electrolitos mucinas, proteínas y productos de deshecho como bilirrubina y metales pesados (Zaefarian et al., 2019; Tancharoenrat et al., 2022). El colesterol, el precursor de la bilis, primero es hidrolizado por la 7- α -hidroxilasa para formar los ácidos biliares cólico y quenodesoxicólico que se combinan con taurina o glicina para formar ácidos taurocólico y glicocólico, que los hacen solubles en agua al pH de la bilis y se secretan como sales biliares (Zaefarian et al., 2019;

Isackson y Ashley, 2014). El 95% de las sales biliares son reabsorbidos y transportados al hígado vía mesentérica superior y la vena portal (Chiang, 2009).

La digestión posterior ocurre en la membrana del borde de cepillo del intestino delgado. Debido a sus funciones metabólicas y de mecanismo de defensa, entre el 54 y el 79% del nitrógeno endógeno total que ingresa al lumen intestinal proviene de las secreciones del intestino delgado, compuestas por células descamadas del epitelio, enzimas epiteliales, algunas proteínas plasmáticas y principalmente mucoproteínas intestinales (Miner-Williams et al., 2009). El epitelio intestinal está formado por una capa de diferentes tipos de células (enterocitos, células caliciformes, células enteroendocrinas, células de Paneth, células M) con diferente función (Gelberg, 2014). Estas células se diferencian en diferentes tipos celulares a partir de células madre de la cripta intestinal que migran hacia la punta de las vellosidades, a excepción de las células de Paneth que migran hacia la cripta, donde por procesos de apoptosis, autofagia o daño celular se descaman hacia el lumen intestinal (Duangnumsaeng et al., 2021). Se estima que para mantener la función del intestino las células epiteliales deben renovarse rápidamente, de 48-72 horas (Modina et al., 2021). Las secreciones endógenas provenientes de la descamación epitelial representan alrededor del 7% de la secreción de nitrógeno en cerdos en crecimiento.

La función principal de los enterocitos es la absorción de nutrientes, por lo tanto, son las células más abundantes del epitelio intestinal y constituyen alrededor del 95, 94 y 89% de las células epiteliales en el duodeno, yeyuno e íleon, respectivamente. La membrana apical del enterocito, conocida como borde de cepillo, está formada por microvellosidades que secretan enzimas digestivas (enteropeptidasa, aminopeptidasa, carboxipeptidasa, endopeptidasa, dipeptidasa, maltasa, lactasa, sucrasa, isomaltasa, nucleasas) y contienen transportadores específicos para carbohidratos, aminoácidos, di y tripéptidos, vitaminas, sales biliares y ácidos grasos. Las células caliciformes secretan continuamente moco para facilitar el transporte del quimo a lo largo del tracto gastrointestinal, pero también funciona como una matriz que mantiene a otras moléculas de defensa secretadas en una ubicación estratégica (Quintana-Hayashi et al., 2018). Las células enteroendocrinas secretan aminas o péptidos con acción endocrina (GLP2, PYY, neurotensina) o paracrina (serotonina, somatostatina). Las células de Paneth secretan lisosimas, lactoferrina, IgA, inhibidores de proteasas (alpha 1-antitrypsin inhibitor and pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI), factores de crecimiento, defensinas y péptidos del factor treofil que protegen contra los

patógenos entéricos. Las células M son células inmunes que captan antígenos del lumen intestinal y por endocitosis los entregan a las células inmunitarias de la mucosa.

Aproximadamente, el 65% de la síntesis de proteína en la mucosa del intestino delgado es dedicada a la producción de mucoproteínas intestinales. Las células caliciformes se encuentran dispersas entre las células epiteliales que cubren las vellosidades intestinales y su proporción se incrementa del intestino proximal al distal (4, 6 y 12% en el duodeno, yeyuno e íleon, respectivamente) (Duangnumsawang et al., 2021). Las células caliciformes secretan continuamente moco. El moco está formado por 95% de agua y el 5% restante está compuesto por sales, lípidos, lisozimas, inmunoglobulinas, defensinas, factores de crecimiento, péptidos antimicrobianos, factores trefoil y especialmente mucinas (McGuckin et al., 2015; Quintana-Hayashi et al., 2018). Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular (1-40 MDa) caracterizadas por un núcleo de proteína, que generalmente se compone de repeticiones en tándem ricas en secuencias de prolina, treonina y serina (dominio PTS), unidos a cadenas laterales de oligosacáridos. La N-acetil galactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamida (GlcNAc), galactosa, fucosa y ácido siálico son los oligosacáridos presentes en las mucinas y representan cerca del 80% de la molécula. Los oligosacáridos le confieren la capacidad de interactuar con otras moléculas, como los nutrientes, y de regular su difusión a través de la capa de moco (Duangnumsawang et al., 2021). Los dos tipos principales de mucinas presentes en el epitelio son mucinas de transmembrana (superficie de la célula) y las mucinas de secreción. Las mucinas de transmembrana se localizan en la superficie apical de las células del epitelio de la mucosa y participan en la defensa de la mucosa traduciendo los estímulos externos en respuestas celulares (Duangnumsawang et al., 2021). Mientras que, las mucinas secretoras pueden ser formadoras de geles (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 y MUC19) o no (MUC7) y pueden variar en su composición de aminoácidos y carbohidratos. Más del 60% de las mucinas se encuentran en todas las regiones del tracto gastrointestinal. Sin embargo, en el estómago MUC5AC es la mucina que se encuentra en mayor proporción, mientras que en el íleon MUC2 es la mucina predominante. Y, las concentraciones de otras mucinas permanecen relativamente constantes en todas las regiones del tracto gastrointestinal (Barmptsalou et al., 2021). Las diferentes regiones del tracto gastrointestinal están asociadas con funciones específicas, y por lo tanto esto refleja el tipo de proteínas encontradas en el moco. Las proteínas asociadas con las vías metabólicas de digestión y

absorción se encuentran en mayor proporción en el moco yeyunal, mientras que las proteínas relacionadas al sistema inmune y péptidos antimicrobianos en el moco del colon. Mientras que las proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos, proteínas, carbohidratos y aminoácidos fueron predominantes en todo el intestino delgado (Bampatsalou et al., 2021). La secreción de mucina puede incrementarse por estímulos externos como neurotransmisores, citocinas, bacterias y sus lipopolisacáridos (Modina et al., 2021). Por lo tanto, el grosor de la capa de moco es mayor en la porción distal del intestino debido al incremento en el número de bacterias intestinales de la parte proximal a distal del intestino (Duangnumsawang et al., 2021).

Por definición, el nitrógeno, proteína o aminoácidos endógenos se refieren a la cantidad o proporción de estos constituyentes en la digesta ileal que no son de origen dietario. Por lo cual, las proteínas de origen bacteriano también son contabilizadas dentro de las pérdidas endógenas y representan del 30-50% de la cantidad del nitrógeno endógeno excretado en el intestino delgado (Moughan y Rutherford, 2012).

2.3. Absorción de nitrógeno endógeno

Durante el proceso digestivo, entre el 60-80% de las secreciones endógenas brutas son digeridas y absorbidas en el intestino delgado junto con las proteínas de la dieta para ser utilizadas en la síntesis de nuevas proteínas endógenas en un proceso conocido como reciclaje de proteínas endógenas (Souffrant et al., 1993). Se estima que aproximadamente el 14% de los componentes del flujo ileal consisten en mucinas intestinales, según la determinación de los principales carbohidratos presentes en las mucinas intestinales, GalNAc y GlcNAc (Miner-Williams et al., 2009). Las altas concentraciones de mucoproteínas en el flujo ileal pueden atribuirse a la relativa resistencia de los polipéptidos de la mucina a las proteasas endógenas, ya que los dominios centrales de la mucina están protegidos por una alta densidad de O-glicosilación, y los animales no secretan enzimas que puedan degradar los O-glicanos (Duangnumsawang et al., 2021). Por lo tanto, la mayor parte de las mucinas son degradadas por las bacterias del intestino grueso, donde los carbohidratos son utilizados como fuente de energía (Corfield, 2001).

Las altas concentraciones de ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, treonina, serina y glicina encontrados en las proteínas endógenas a nivel ileal son consistentes con las altas proporciones de estos aminoácidos en el núcleo de proteína de las mucinas del tracto

gastrointestinal (Ravindran, 2021), especialmente treonina, serina y prolina, que representan el 90% de los aminoácidos de la región glicosilada de los polímeros de la mucina.

Debido a que la mayor parte de la digestión y absorción de los aminoácidos ocurre en la porción proximal del intestino delgado, esta porción prioriza la proliferación de las células absorbivas mientras que las células de secreción de mucina se incrementan del intestino proximal al distal, en consecuencia, las mucinas secretadas en la región distal tienen menor oportunidad de ser digeridas y reabsorbidas. Por lo tanto, las proteínas y aminoácidos encontrados en el íleon terminal están influenciadas por su punto de entrada al intestino. Sin embargo, no todos los aminoácidos se absorben a la misma velocidad. Glicina, treonina, serina, ácido aspártico y el ácido glutámico se absorben más lentamente que otros aminoácidos (Taverner et al., 1981). Esto puede deberse a que después de la digestión de las proteínas, solo los aminoácidos neutros y básicos son cuantitativamente absorbidos desde el intestino como aminoácidos libres, mientras que prolina, glicina, serina, treonina, ácido aspártico y ácido glutámico parecen entrar como constituyentes de pequeños péptidos y son hidrolizados por peptidasas intracelulares (Taverner et al., 1981), lo que podría incrementar las concentraciones de estos aminoácidos en el flujo ileal (Ravindran, 2021).

Además, los transportadores de aminoácidos localizados en la membrana del enterocito no se encuentran en las mismas cantidades en todas las porciones del intestino. Morales et al. (2017) reportaron que los transportadores de aminoácidos neutros B⁰AT₁, que tienen preferencia por metionina, leucina, isoleucina y valina, se mantienen constantes a lo largo del duodeno, yeyuno e íleon, lo que podría facilitar la absorción de estos aminoácidos a lo largo de todo el intestino delgado. Estos aminoácidos se encuentran en bajas concentraciones en el flujo ileal y son relativamente constantes independientemente del método de determinación de los aminoácidos endógenos. Sin embargo, las bajas concentraciones de algunos aminoácidos, como metionina, también puede deberse a que las proteínas endógenas están esencialmente desprovistas de metionina o se encuentran en bajas concentraciones en secreciones intestinales (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Perfil de aminoácidos (porcentaje molar) de las secreciones endógenas del tracto gastrointestinal y bacterias intestinales.

	Pepsina	Tripsina	Amilasa	Quimotripsina	Aminopeptidasa	Maltasa	MUC2	Microbiana
Gly	8.6	11.3	10.6	10.8	4.8	6.7	7.9	9.0
Glu	7.4	7.7	3.9	0.7	5.7	5.0	4.7	13.1
Ala	4.9	6.8	6.3	6.3	7.7	5.7	5	11.0
Pro	4.5	4.0	4.1	4.9	4.7	6.1	9.7	5.1
Asp	11.9	10.6	5.9	4.1	5.1	6.6	4.7	11.9
Leu	6.5	7.4	5.7	10.8	10.4	9.1	6.4	7
Lys	2.5	4.3	3.9	2.6	4.4	3.3	3.1	5.4
Ser	11.3	12.1	6.7	11.2	7.4	7.7	7.7	6.3
Ile	6.4	6.9	4.9	4.9	5.2	4.9	2.3	4.8
Val	6.9	7.2	8	8.6	6.5	6.8	5.3	7.5
Thr	7.8	4.5	4.3	5.2	6.7	5.9	17	6.4
Arg	1.3	1.7	5.5	3.4	3.2	4.6	3.5	3.3
Phe	6.0	1.8	5.3	0.7	4.3	5	2.7	3.8
His	1.1	1.7	1.8	2.2	2.2	2.1	2.8	1.8
Tyr	6.4	3.7	3.7	3	3.9	5.3	3	2.5
Met	2.8	1	2	0.4	2.6	2.1	0.6	1.6
Cys	2.3	5.2	2.5	3.7	0.6	1.2	6.3	1.7
Trp	1.7	1.8	3.9	3.7	2.6	2.5	1.2	0.7
Asn			7.4	7.1	6.7	5.3	2.7	
Gln			3.3	5.6	5.3	4.1	3.7	

Modificado de Macelline et al. (2021) con datos de <https://www.uniprot.org/>

Las altas concentraciones de ácido glutámico, ácido aspártico, treonina y serina en el flujo ileal también podrían deberse a la composición de las bacterias intestinales. Ya que las bacterias gram positivas y gram negativas del intestino incorporan grandes cantidades de ácido glutámico más glutamina, ácido aspártico más asparagina, lisina, aminoácidos ramificados, treonina y serina, que son “esenciales” para su óptimo crecimiento en el intestino (Dai et al., 2011). Y, al igual que las células inmunes tienen un papel importante en la salud intestinal, por lo que debido a su importancia relativa pueden resistir a la degradación masiva del intestino. Estudios proteómicos han demostrado que alrededor del 25% de las proteínas identificadas en el íleon de los cerdos son proteínas inmunitarias (Li et al., 2018).

Por lo tanto, la composición de las pérdidas endógenas puede variar en función del nivel de secreción y la composición de las proteínas endógenas secretadas, el punto de entrada al intestino, la tasa de absorción de aminoácidos en el intestino delgado y la importancia relativa de los aminoácidos en el metabolismo intestinal (Ravindran, 2021).

2.4. Determinación de las pérdidas endógenas basales de proteína y aminoácidos

La determinación de las pérdidas endógenas basales de proteína aminoácidos se realiza mediante dietas semipurificadas, donde se asume que todos los aminoácidos recuperados en el flujo ileal son de origen endógeno. Las pérdidas endógenas basales de aminoácidos se miden típicamente usando un marcador indigestible, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$PEB_{Iaa} = AAdigesta \times \left(\frac{Mdieta}{Mdigesta} \right)$$

Donde PEB_{Iaa} es la pérdida endógena basal de aminoácidos en g/Kg de materia seca consumida (MSC), $AAdigesta$ es la concentración de aminoácidos en la digesta ileal (g/Kg de MS) y $Mdieta$ y $Mdigesta$ son las concentraciones del marcador indigestible en la dieta y en la digesta, respectivamente (g/Kg de MS).

Los aminoácidos más abundantes en el flujo ileal son el ácido glutámico, ácido aspártico, treonina, prolina, serina y glicina (Ravindran, 2021). Sin embargo, diversos factores como la edad y el peso corporal (Mariscal-Landín y Reis de Souza, 2006), el estado proteínico, el estado sanitario, el consumo de materia seca (Moter y Stein, 2004) y energía (Liu et al., 2020) y el método por el cual se determinan pueden afectar el nivel y la composición de los aminoácidos en las pérdidas endógenas basales de aminoácidos ileales (**Cuadro 3**) (Adeola et al., 2016; Park y Adeola, 2020).

Cuadro 3. Diferencias en el perfil de aminoácidos en las pérdidas endógenas determinadas por diferentes métodos (Adeola et al., 2016).

	Dieta libre de N	Dieta Caseína	Regresión
aa indispensables			
Arginina	0.59	0.73	0.43
Histidina	0.17	0.37	0.23
Isoleucina	0.3	0.46	0.43
Leucina	0.5	0.61	0.63
Lisina	0.4	0.47	0.50
Metionina	0.11	0.35	0.13
Fenilalanina	0.32	0.32	0.43
Treonina	0.52	0.73	0.70
Triptófano	0.13		0.17
Valina	0.46	0.59	0.57
aa no indispensables			
Alanina	0.57	0.68	0.57
Ácido aspártico	0.75	1.01	0.93
Cisteína	0.17	0.67	0.25
Ácido glutámico	0.94	1.7	1.33
Glicina	1.46	1.45	0.70
Prolina	4.95	6.2	0.67
Serina	0.65	0.9	0.77
Tirosina	0.35	0.25	
Total	13.3	17.42	9.37

2.4.1. Dietas libres de nitrógeno

El método con dietas libres de nitrógeno es preferido debido a la simplicidad y a la definición de las pérdidas endógenas basales de aminoácidos (Kong y Adeola, 2014). En este método, los cerdos son alimentados con dietas libres de nitrógeno formuladas a base de almidón de maíz, dextrosa o sucrosa, fibra insoluble (celulosa), aceite vegetal y una premezcla de vitaminas y minerales, bajo la suposición de que todos los aminoácidos

encontrados a nivel ileal son de origen endógeno y que la dieta permite los procesos digestivos normales (Kong y Adeola, 2014; Stein et al., 2007b). Sin embargo, se ha observado que la alimentación con dietas libres de nitrógeno conduce a diferentes anormalidades fisiológicas y metabólicas que pueden afectar las determinaciones de las pérdidas endógenas basales, lo cual ha sido la principal crítica a este método (Adeola et al., 2016; Jansman et al., 2002).

Durante periodos de restricción de proteína, ocurren cambios metabólicos adaptativos para mantener el balance de proteína corporal (Garlick et al., 1999). En el musculo esquelético se incrementa la degradación de proteína para mantener la función del intestino y el sistema inmune (Garlick et al., 1999; McNurlan et al., 1979). La proteína muscular es desaminada, incrementando la producción de urea en el hígado y los niveles plasmáticos de urea (Yin et al., 2017). A su vez, en el hígado y en el intestino se reduce la síntesis de proteína y disminuye la degradación (Garlick et al., 1999; McNurlan et al., 1979). En hígado se reduce la síntesis de albumina, que es sintetizada en el hígado estimulada por el consumo de proteína en la dieta. La albumina sirve como un almacenamiento temporal de aminoácidos esenciales para prevenir la pérdida por oxidación y, en el periodo posabsortivo, puede liberar aminoácidos esenciales para que sean utilizados por el músculo y otros tejidos para mantener la síntesis de proteína (Caso et al., 2007). La restricción de proteína en la dieta también modifica el metabolismo de lípidos, a través de la regulación de genes relacionado con la lipogénesis (Otani et al., 2020). En animales suplementados con dietas bajas en proteína se observó mayor cantidad de grasa subcutánea y un incremento en los triglicéridos, el colesterol y el colesterol de alta densidad (HDL).

El incremento en la degradación de la proteína muscular conduce a un incremento en los niveles de prolina y glicina en el flujo ileal cuando los animales son alimentados con dietas libres de nitrógeno por periodos prolongados de tiempo (Adeola et al., 2016). En algunos casos, prolina puede representar más del 30% de la cantidad total de aminoácidos en la digesta ileal de los cerdos (Jansman et al., 2002). De Lange et al. (1989) sugieren que el alto contenido de prolina en el flujo ileal es resultado de la liberación de glutamina, que se encuentra en grandes cantidades en la proteína muscular. El intestino exhibe altas tasas de síntesis de proteína para mantener su actividad secretora, y este proceso depende principalmente de los nutrientes de la dieta (Sarri et al., 2024). Por lo que, para mantener sus funciones durante periodos de restricción, el tracto gastro intestinal toma grandes

cantidades de glutamina que es metabolizada a glutamato, amoníaco, citrulina y prolina en el tracto gastrointestinal para ser utilizado como fuente de energía. Además, la baja actividad de la enzima prolina oxidasa que degrada prolina conduce a una acumulación en los enterocitos que posteriormente es difundida hacia el lumen intestinal (de Lange et al., 1989; Mariscal-Landin et al., 1995). La administración de aminoácidos intravenosos a cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno reduce significativamente la pérdida endógena de prolina, sugiriendo que el catabolismo de proteína se mantiene normal después de la infusión (de Lange et al., 1989). Por lo tanto, el incremento de prolina en el flujo ileal ha sido considerado como un indicador de que el animal no se encuentra en un estado fisiológico normal.

A nivel intestinal, la composición y el nivel de proteína y aminoácidos de la dieta tienen un papel importante en la regulación de vías metabólicas esenciales para el mantenimiento, crecimiento y la inmunidad a través de la activación de vías de señalización celular y la expresión de proteínas y péptidos con diferentes funciones en el tracto gastro intestinal (Chen et al., 2018). Corring et al, (1984) cuantificaron la secreción pancreática y concluyeron que las dietas libres de proteína eran adecuadas para las determinaciones del nitrógeno endógeno total en el tracto gastrointestinal. Haga clic o pulse aquí para escribir texto.. Sin embargo, estudios más recientes han observado que la alimentación con dietas libres de proteína afecta potencialmente la estimación de las pérdidas endógenas basales de aminoácidos al reducir la secreción intestinal. Se estima que las pérdidas endógenas son 20% menores en cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno. Esto podría deberse a diferentes factores, como la reducción en la secreción pancreática, ya que es estimulada, en parte, por la presencia de péptidos en el tracto gastrointestinal. El patrón de enzimas sintetizadas y secretadas por el páncreas se adapta a la composición del alimento durante un periodo de varios días (Kurz y Seifert, 2021). Estudios en ratas han observado que los animales alimentados con una dieta baja en proteínas secretaron menos tripsina y quimotripsina pancreáticas que los animales alimentados con una dieta alta en proteínas (Kurz y Seifert, 2021). La expresión génica de las enzimas digestivas fue estudiada por He et al. (2016) quienes demostraron que los cerdos en crecimiento alimentados con un contenido de proteína cruda del 12% en la dieta tenían un nivel más bajo de ARNm de tripsinógeno, quimotripsina B y quimotripsina C en comparación con los animales con un contenido de proteína cruda del 18 % en la dieta. Sin embargo, las secreciones de amilasa

pancreática podrían verse incrementadas, ya que la disminución de proteína en la dieta incrementa los niveles de almidón en la dieta (Macelline et al., 2021). En pollos alimentados con dietas libres de nitrógeno y diferentes niveles de almidón y dextrosa también se observó que los niveles maltasa, sucrasa y lipasa se incrementaron en comparación con animales que consumieron dietas a base de maíz-soya. El incremento de las diferentes enzimas digestivas también podría deberse a la acumulación de estas enzimas para ser recicladas como parte de un proceso de conservación (Zhou et al., 2022). Por el contrario, la actividad enzimática reducida en el estado libre de proteínas podría conducir a una digestibilidad reducida de la proteína endógena y, por lo tanto, acumulación de nitrógeno endógeno al final del íleon (Moughan et al., 1998).

Además, el alto nivel de almidón y dextrosa en las dietas libres de nitrógeno podría promover la secreción de mucina al incrementar el número de células caliciformes, debido a una mayor acumulación de bacterias en el intestino (Zhou et al., 2022). En contraste, se ha observado una reducción en la secreción de mucina debido a la deficiencia de algunos aminoácidos. En pollos alimentados con dietas bajas en proteína con bajos niveles de treonina, prolina y serina se observó una reducción en la excreción de mucina (Duangnumswang et al., 2021).

Teóricamente, la digestibilidad ileal estandarizada de aminoácidos debe ser independiente del nivel de proteína cruda y aminoácidos de las dietas, si las pérdidas endógenas basales son corregidas. Sin embargo, si las pérdidas endógenas basales de aminoácidos inducidas por una dieta con niveles normales de proteína fueron subestimadas por el método libre de nitrógeno, los valores de digestibilidad ileal estandarizada determinados en una dieta alta en proteína pueden ser mayores que los de una dieta baja en proteína (Liu et al., 2020).

2.4.2. Dietas con proteína altamente digestible

La inclusión de proteínas altamente digestibles para estimar de las pérdidas endógenas basales de aminoácidos es una alternativa para aminorar los efectos fisiológicos y metabólicos adversos de las dietas libres de proteína. Además, dado que las dietas siempre contienen proteína algunos autores sugieren que se deben utilizar dietas con proteína para la estimación (Ravindran, 2021). Este método se basa en la inclusión de proteína altamente digestible, como caseína, y supone que la proteína añadida es completamente digerida y

absorbida, por lo que los aminoácidos recuperados en el flujo ileal son de origen endógeno. La digestibilidad de la caseína debe medirse dentro de cada estudio para garantizar que los aminoácidos en el flujo ileal son de origen endógeno (Adeola et al., 2016). Se ha estimado que la digestibilidad de la caseína es mayor al 94% (Deglaire et al., 2019).

Las pérdidas endógenas basales de aminoácidos se incrementan cuando se utilizan dietas con caseína en comparación con las dietas libres de nitrógeno (Zhang et al., 2002; Kong y Adeola, 2014; Brestenský et al., 2017). Esto puede deberse a una mayor secreción gástrica de mucina en respuesta a un incremento en la secreción de pepsina, quimosina y ácido clorhídrico cuando la caseína entra al estómago (Miner-Williams et al., 2014), además del incremento en la secreción de mucina intestinal y de enzimas pancreáticas necesarias para la digestión de la caseína (Brestenský et al., 2017). También podría deberse a un incremento en las bacterias intestinales. Sin embargo, algunos estudios no han observado diferencias en la pérdida endógena de aminoácidos estimada por diferentes métodos, posiblemente debido al bajo nivel de inclusión de caseína a las dietas (6%) (Park y Adeola, 2020).

Los cerdos alimentados con dietas que contienen caseína reportan mayores pérdidas endógenas basales de ácido glutámico, isoleucina y serina, y niveles más bajos de prolina y tirosina en comparación con las dietas libres de nitrógeno (Brestenský et al., 2017; Park y Adeola, 2020). El incremento en las pérdidas endógenas basales de ácido glutámico en las dietas con caseína puede deberse a los altos niveles de ácido glutámico en la caseína (52.3 g/Kg) y a su lenta digestión. Sin embargo, no es claro por qué se incrementan los niveles de isoleucina y serina cuando se añade caseína a las dietas libres de nitrógeno (Park y Adeola, 2020). Se especula que el incremento en el consumo de aminoácidos puede estar afectado por la absorción o el metabolismo de isoleucina y serina en el tracto gastrointestinal de los cerdos (Park y Adeola, 2020) o a la lenta digestión y a una liberación diferente de aminoácidos de los enlaces peptídicos de la caseína (Lacroix et al., 2006).

Algunos estudios han evidenciado un incremento en la pérdida endógena basal de los aminoácidos esenciales lisina, treonina y triptófano dependiendo del método utilizado para su determinación. Considerando que estos aminoácidos son limitantes en las dietas maíz-soya, la metodología para estimar las pérdidas endógenas basales de aminoácidos es importante, ya que puede afectar los coeficientes de digestibilidad ileal estandarizada de

estos aminoácidos en las dietas (Park y Adeola, 2020). Por ello, es fundamental profundizar en la comprensión de los métodos de estimación de las pérdidas endógenas basales.

3. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio evalúa los cambios metabólicos a nivel plasmático inducidos por dos métodos comúnmente utilizados para determinar las pérdidas endógenas basales de aminoácidos, con el objetivo de determinar el efecto del estado metabólico del animal en las secreciones endógenas presentes en la digesta ileal. Además, este estudio identifica y cuantifica las proteínas de la digesta ileal a través de análisis proteómicos y bioinformáticos. Las proteínas identificadas representan la fuente de los aminoácidos estimados mediante análisis convencionales (HPLC). Este enfoque, por lo tanto, representa una herramienta complementaria a los métodos existentes para obtener información detallada sobre el efecto de la composición de la dieta en las secreciones intestinales.

El método para determinar las pérdidas endógenas basales puede afectar los coeficientes de digestibilidad ileal estandarizada de los aminoácidos de la dieta (Park y Adeola, 2020). Los análisis convencionales no proporcionan información sobre la fuente de los aminoácidos endógeno en la digesta ileal, lo que dificulta explicar el origen de las variaciones en el perfil de aminoácidos. Comprender los factores que influyen en las pérdidas endógenas basales de aminoácidos ayudará a mejorar la utilización de nutrientes a través de la optimización de la formulación de las dietas y el desarrollo de estrategias de alimentación que promuevan el desempeño productivo y la salud intestinal (Cowieson et al., 2017; Zhang et al., 2017).

4. HIPOTESIS

Los análisis proteómicos permiten identificar y cuantificar los cambios en el perfil de proteínas de origen endógeno que dan origen a los aminoácidos encontrados en la digesta ileal de cerdos en crecimiento que se encuentran en diferente estado metabólico.

5. OBJETIVOS

Identificar y cuantificar a través de análisis proteómicos a las proteínas presentes en la digesta ileal y determinar su relación con las pérdidas endógenas basales de aminoácidos, así como el impacto de la dieta en los metabolitos plasmáticos de cerdos en crecimiento.

5.1. Objetivos específicos:

1. Determinar los cambios en los metabolitos plasmáticos en cerdos en crecimiento alimentados con diferentes dietas utilizadas para la determinación de las pérdidas endógenas basales.
2. Determinar las pérdidas endógenas basales de aminoácidos a nivel ileal utilizando dos diferentes métodos: Dietas libres de nitrógeno y Dietas con caseína.
3. Identificar y cuantificar a través de análisis proteómicos a las proteínas presentes en la digesta ileal, así como su relación con la composición de la dieta.

6. METODOLOGÍA

Se realizó un experimento con cerdos en crecimiento alimentados con dietas libres de nitrógeno y dietas con caseína. Los resultados generados se presentan a continuación en dos artículos enviados a revistas indexadas.

7. ARTÍCULO 1

Determinación de metabolitos plasmáticos y pérdidas endógenas basales de aminoácidos en cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno o caseína.

Determination of plasma metabolites and basal ileal endogenous amino acid losses in growing pigs fed a nitrogen-free or casein diet.

Iris Elisa Avila Arres¹, Tércia Cesária Reis de Souza ², Ericka Ramírez Rodríguez³, Gerardo Mariscal Landín^{3*}

¹ Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México

²Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, México. Avenida de las Ciencias s/n, Colonia Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui 76230, Querétaro, 12 México.

³Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP, Km 1 carretera a Colón, Querétaro, México

Artículo enviado a: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*

ORIGINAL ARTICLE

Pigs

Determination of Plasma Metabolites and Basal Ileal Endogenous Amino Acid Losses in Growing Pigs Fed a Nitrogen-Free or Casein Diet

Iris Elisa Ávila-Arres¹ | Tércia Cesária Reis De Souza²  | Ericka Ramírez-Rodríguez³ | Gerardo Mariscal-Landín³ 

¹Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Mexico | ²Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Mexico | ³Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP, Querétaro, Mexico

Correspondence: Gerardo Mariscal-Landín (mariscal.gerardo@inifap.gob.mx)

Received: 30 August 2023 | **Revised:** 17 September 2024 | **Accepted:** 24 October 2024

Funding: This study was supported by the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-México), the Research Project SIGI, No. 13202534765.

Keywords: basal ileal endogenous losses | casein | nitrogen-free diets | pigs | plasma metabolites

ABSTRACT

The nitrogen-free diet (NFD) method for determining basal ileal endogenous losses (BEL) of amino acids (AA) has been associated with different metabolic abnormalities that can affect the accurate determination of BEL. Consequently, the use of highly digestible proteins has been suggested. This study aimed to determine the metabolic status and BEL of AA in pigs fed either an NFD or a casein (CAS) diet. Eight cannulated, castrated male pigs (39.8 kg) were randomly assigned to a 2 × 2 crossover design. An NFD diet based on corn starch, dextrose, cellulose, oil, vitamins and minerals was used. The CAS diet was equivalent, but 18% of the corn starch was replaced with casein. Pigs were fed one of the diets for a 7-day period, and blood samples were collected at the beginning and end of each period to determine plasma metabolites. Ileal digesta samples were collected on Days 6 and 7 to estimate the BEL of the AA. Results indicated that plasma albumin was significantly higher ($p < 0.05$) in pigs fed the CAS diet, whereas creatinine and LDL levels were higher ($p < 0.03$) in pigs fed the NFD. No significant differences were observed in the levels of other plasma metabolites. The BEL of protein did not differ between diets. However, in pigs fed the CAS diet, the BEL of glutamic acid, aspartic acid, serine, glycine, histidine, threonine, alanine, tyrosine and valine significantly increased ($p < 0.05$), while isoleucine showed a tendency to increase ($p = 0.06$). In conclusion, NFD did not significantly affect energy and lipid metabolism in pigs. However, the decrease in albumin synthesis and increase in plasma creatinine levels indicate that pigs fed NFD have a negative protein balance, affecting the estimation of the BEL of AA. Therefore, it is essential to consider the metabolic state of animals when estimating the BEL of AA.

1 | Introduction

Pig diet formulations are currently based on the standardized ileal digestibility (SID) of amino acids in diet ingredients, which is also used to estimate amino acid requirements of pigs at all stages of production (National Research Council 2012). The quantification of basal ileal endogenous losses (BEL) of amino

acids (AA) is essential to calculate the SID (Ravindran 2021). The main sources of amino acids BEL in the gastrointestinal tract (GIT) are salivary secretions, gastric secretions, digestive enzymes, mucin, bile secretions, epithelial desquamation and bacterial proteins (Adeola et al. 2016; Nyachoti et al. 1997). The BEL of amino acids is defined as the unavoidable loss of protein and amino acids associated with metabolic functions related to the

© 2024 Wiley-VCH GmbH.

physical flow of feed dry matter through the GIT and represents the lowest expected loss under any feeding situation; hence, it is considered independent of diet composition (Stein et al. 2007). The amino acid BEL is typically estimated by collecting ileal digesta samples from pigs fed a nitrogen-free diet through a single T-cannula surgically implanted in the terminal ileum (Stein et al. 2007). The nitrogen-free diet approach for estimating the amino acid BEL is the most extensively used method because of its simplicity, definition and consistent results (Adeola et al. 2016). However, the use of nitrogen-free diet is associated with different metabolic abnormalities that can affect BEL determination (Jansman et al. 2002; Ma et al. 2018; Moughan, Souffrant, and Hodgkinson 1998; Ravindran et al. 2008; Tian et al. 2016, 2019); thus, diets with highly digestible proteins such as casein are more acceptable from a metabolic perspective. Dietary protein, amino acids and their metabolites play crucial roles in regulating metabolic pathways essential for maintenance, growth and immunity through the activation of cellular signaling pathways and gene expression in adipose and skeletal muscle tissue, as well as participating in energy metabolism (Chen, Michalak, and Agellon 2018; Wu 2013). During periods of protein restriction, adaptive metabolic changes occur to maintain protein balance (Garlick, McNurlan, and Patlak 1999). In skeletal muscle, protein degradation increases to maintain gut and immune system function, while in the liver and intestine, protein synthesis and degradation decrease and endogenous amino acid recycling increases (Garlick, McNurlan, and Patlak 1999; McNurlan, Tomkins, and Garlick 1979). The intestine exhibits higher rates of protein synthesis to maintain its secretory activity, and this process depends on the diet nutrients, mainly (Sarri et al. 2024); hence, nitrogen-free diet can affect endogenous protein synthesis and secretion, impacting the estimation of basal endogenous losses (Butts et al. 1993; Moughan, Souffrant, and Hodgkinson 1998; Nyachoti et al. 1997). The mobilization of body stores under protein restriction affects the circulating plasma metabolites due to metabolic adaptations. Therefore, changes in plasma metabolites have been used as indicators of the relationship between nutrient supply and metabolic status (Camp Montoro et al. 2022). This study aimed to determine changes in plasma metabolites and the relationship with BEL of proteins and amino acids in pigs fed nitrogen-free or casein diets, given the lack of information on the metabolic response of pigs used for the determination of BEL.

2 | Materials and Methods

All experimental procedures were approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) and followed the guidelines of the Mexican Official Standard (Diario Oficial de la Federación 2001) on the technical specifications for the production, care and use of laboratory animals.

2.1 | Animals and Housing

Eight castrated male pigs [PIC 337 × (Landrace × Large White); initial body weight 39.8 ± 6.3 kg] were surgically implanted with a T-cannula in the distal ileum (Reis de Souza et al. 2000).

Pigs were housed individually in metabolism cages with slatted floors (0.80 m²) fitted with a feeder and a nipple drinker in a temperature-controlled room (19°C).

2.2 | Diets and Experimental Design

Two experimental diets were formulated: a nitrogen-free diet (NFD) (Stein et al. 2007) and a casein (CAS) diet, in which casein replaced 18% of the starch in the nitrogen-free diet (Table 1). The diets were adequate for all nutrients except nitrogen and amino acids (National Research Council 2012). Titanium dioxide was added to the diets at 4 g/kg as a digestibility marker. Feeding was restricted to 2.5 times their maintenance energy requirement (110 kcal ME/kg of BW^{0.75}, (Institut National de la Recherche Agronomique 1984). Pig weights were recorded at the start of each experimental period to recalculate daily feed amounts. The calculated feed was divided into two equal meals per day. All diets were provided in meal form. Pigs had unrestricted access to water during the experiment. Pigs were randomly assigned to one of the two experimental diets and two periods in a 2 × 2 crossover design, and each experimental period consisted of 7 days, with a 7-day washout interval in between to allow the animals to return to their normal metabolic levels.

2.3 | Sample Collection

The first 5 days of each experimental period were considered a diet adaptation period. Ileal digesta samples were collected for a 12-h period on Days 6 and 7 of the trial using plastic bags

TABLE 1 | Experimental diets composition (as-fed basis).

	NFD	CAS
Ingredients, g/kg		
Maize starch	795.4	615.4
Casein		180.0
Dextrose	100.0	100.0
Soybean oil	30.0	30.0
Cellulose	40.0	40.0
Calcium carbonate	5.0	5.0
Orthophosphate	19.0	19.0
Salt	4.0	4.0
Potassium bicarbonate	0.5	0.5
Magnesium oxide	0.1	0.1
Titanium dioxide	4.0	4.0
Vitamin mineral premix ^a	2.0	2.0
Calculated nutrient content		
Metabolizable energy, Kcal, kg	3481	3473
Crude protein, %	0.0	16.0
Crude fibre, %	2.86	2.83

^a Provided per kilogram of diet: Co 0.42 mg, Cu 8.4 mg, Fe 70 mg, I 0.56 mg, Mn 21 mg, Se 0.18 mg, Zn 84 mg, vitamin A 10,100 IU, vitamin D3 2000 IU, vitamin E 120 mg, vitamin K 8 mg, thiamine 0.35 mg, riboflavin 10 mg, pyridoxine 6 mg, cyanocobalamin 0.05 mg, niacin 60 mg, pantothenic acid 35 mg, folic acid 1.5 mg, biotin 0.3 mg.

attached to the cannula cylinder. The bags were replaced every 30 min or when they were full. To minimize microbial and enzymatic activity, 10 mL of 0.2 M hydrochloric acid was added to each plastic bag. Samples from each pig and each period were homogenised and stored at -20°C until freeze-dried. Fasting blood samples were taken from each pig at the start of the experimental period (initial sample) and at the end of each period to examine plasma metabolites. Blood was collected by jugular venipuncture using a vacutainer system (BD Vacutainer Blood Collection System, USA) with sodium heparin vacuum tubes for biochemical analysis and EDTA vacuum tubes for lipid analysis (BD Vacutainer Blood Collection Tubes, USA). Samples were immediately chilled at 4°C in a cooler and transported to a veterinary laboratory for further analysis.

2.4 | Chemical Analysis

After freeze-drying, the ileal digesta samples were ground to pass through a 0.5 mm screen using a laboratory mill grinder (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, USA). Samples of the ingredients, diets and ileal digesta were analysed for dry matter (DM) and nitrogen (N) content according to AOAC methods 934.01 and 976.05, respectively (Association of Official Analytical Chemists 2000). The crude protein content was calculated as $\text{N} \times 6.25$. The samples were prepared for amino acid determination using AOAC method 994.12 (Association of Official Analytical Chemists 2000), which entails hydrolyzing the samples in 6 M hydrochloric acid at 110°C for 24 h. AA analyses were performed using reversed-phase high-performance liquid chromatography, as described by Henderson et al. (2000). Methionine, cysteine and tryptophan were not analysed. Diets and ileal digesta were analysed for titanium using the procedure described by Myers et al. (2004). Immediately after arriving at the laboratory, all blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C to separate the plasma. Plasma aliquots were stored at -20°C until analysis of plasma metabolites. The plasma samples were analysed for glucose, total protein, albumin, globulin, urea, creatinine, AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), cholesterol, high-density lipoproteins (HDL), low-density lipoproteins (LDL), very low-density lipoproteins (VLDL) and triglycerides using an automatic blood biochemical analyser (BA400; BioSystems S.A., Barcelona, España) with reagents from the same manufacturer. Plasma nonesterified fatty acids (NEFA) were measured using an automated clinical chemistry analyser with the Randox NEFA Assay (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK).

2.5 | Calculations and Statistical Analysis

The basal ileal endogenous losses of proteins and amino acids were calculated using the equations described by Stein et al. (2007). Data normality was confirmed using the UNIVARIATE procedure in SAS (SAS Version 9.2 2008). Using the MIXED procedure in SAS and the pig as the experimental unit, BEL data and plasma metabolites were analysed as a 2×2 crossover model. Initial plasma metabolite measurements were considered as covariates for plasma metabolites (Mehrotra 2014). The LS-means statement in SAS was used to calculate least-squares

means. Statistical significance was set at $p < 0.05$. A tendency was considered when the p value was between 0.05 and 0.10.

3 | Results

3.1 | Plasma Metabolites

The plasma metabolite concentrations are presented in Table 2. The addition of casein to the diet did not affect glucose levels. Plasma albumin concentrations were higher in pigs fed the CAS diet ($p < 0.05$). However, no significant differences in total protein, globulin and urea levels were found. Plasma creatinine concentrations were higher in pigs fed nitrogen-free diet ($p < 0.02$). There were no differences between AST and ALT levels. Plasma cholesterol levels were similar between the diets. However, a reduction in LDL was observed in pigs fed the nitrogen-free diet ($p < 0.03$). Differences were not observed in triglyceride or NEFA.

3.2 | Basal Ileal Endogenous Losses

Table 3 presents the BEL of protein and amino acids in pigs fed the nitrogen-free and casein diets. There was no significant difference in ileal endogenous crude protein loss between diets. The BEL of aspartic acid, glutamic acid, serine, histidine, glycine, threonine, alanine, tyrosine and valine were higher ($p < 0.05$) in pigs fed the casein diet than those in pigs fed the nitrogen-free diet, and a trend for increasing isoleucine was observed ($p = 0.06$). Proline, glutamic acid, glycine and leucine were the most abundant amino acids in nitrogen-free diet-fed

TABLE 2 | Plasma metabolites of pigs fed nitrogen-free (NFD) or casein (CAS) diet.

	Diet		SEM	p value
	NFD	CAS		
Glucose, mg/dL	75.15	81.86	3.819	0.35
Total protein, g/dL	6.71	7.00	0.204	0.34
Albumin, g/dL	2.84	3.14	0.108	0.02
Globulins, g/dL	3.85	3.87	0.158	0.95
Urea, mg/dL	17.21	18.53	1.804	0.62
Creatinine, mg/dL	1.85	1.55	0.075	0.02
AST, UI/L	35.17	27.38	5.389	0.34
ALT, UI/L	53.31	44.27	3.839	0.13
Cholesterol, mg/dL	95.06	95.15	6.330	0.99
HDL, mg/dL	46.87	40.41	3.073	0.17
LDL, mg/dL	36.69	48.88	3.433	0.03
VLDL, mg/dL	10.71	5.95	2.026	0.13
Triglycerides, mg/dL	36.73	28.15	5.460	0.29
NEFA, mg/dL	22.21	21.82	1.889	0.89

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; HDL, high-density lipoproteins; LDL, low-density lipoproteins; NEFA, nonesterified fatty acids; SEM, standard error of the mean; VLDL, very low-density lipoproteins.

TABLE 3 | Basal ileal endogenous protein and amino acids losses in pigs fed nitrogen-free (NFD) and casein (CAS) diet.

	Diet		SEM	p value
	NFD	CAS		
Crude protein, g/kg	12.40	14.43	1.282	0.21
Indispensable amino acids, g/kg DMI				
Arginine	0.39	0.47	0.045	0.25
Histidine	0.27	0.47	0.041	0.05
Isoleucine	0.29	0.48	0.048	0.06
Leucine	0.49	0.72	0.087	0.11
Lysine	0.23	0.31	0.039	0.22
Phenylalanine	0.37	0.58	0.096	0.18
Threonine	0.25	0.47	0.039	0.02
Valine	0.39	0.79	0.064	0.01
Non-essential amino acids, g/Kg DMI				
Aspartic acid	0.54	0.88	0.071	0.02
Glutamic acid	0.70	2.06	0.244	0.01
Alanine	0.38	0.67	0.061	0.02
Glycine	0.59	0.98	0.097	0.04
Proline	1.25	0.97	0.211	0.32
Serine	0.32	0.75	0.046	0.001
Tyrosine	0.33	0.50	0.060	0.04

Abbreviations: DMI, dry matter intake; SEM, standard error of the mean.

pigs. In casein-fed pigs, glutamic acid, glycine, proline and aspartic acid were the most abundant amino acids.

4 | Discussion

Nitrogen-free diet is the most commonly used method for estimating the BEL of amino acids. However, nitrogen-free diets are considered non-physiological because of the increased degradation of body proteins to release amino acids and maintain biological functions (Adeola et al. 2016). Plasma metabolites provide information about the body's protein status (albumin, urea), muscle mass (creatinine) and lipid metabolic status. Consequently, one of the objectives of this study was to use plasma metabolites to monitor the metabolic status of pigs. The results of the plasma metabolites in the present study can be regarded as being within the normal range, except for creatinine, which was elevated, and cholesterol, which decreased in both diets (Klem et al. 2009).

Albumin is the most abundant protein in the plasma. Serum albumin modulates plasma oncotic pressure and transports endogenous and exogenous molecules (Caso et al. 2007). In the liver, albumin synthesis is acutely stimulated by protein consumption to temporarily store essential amino acids from the diet (Busher 1990; Caso et al. 2007). As a result, pigs fed nitrogen-free diet showed a decrease in plasma albumin concentration. Other studies have also found that decreasing protein or amino acid content in the diet decreased albumin synthesis (Hellwing, Tauson, and Skrede 2007; Regmi et al. 2018; Wykes et al. 1996).

However, there were no significant differences in globulin and total protein levels between the diets. Increases or decreases in globulins are usually linked to acute inflammation or stress rather than nutritional deficiencies (Bertholf 2014; Busher 1990). Urea is the end-product of the catabolism of absorbed dietary amino acids that are not used, as well as those derived from cellular turnover, and plasma urea concentration reflects nitrogen utilization efficiency (Marin-García et al. 2022). Although plasma urea concentrations in animals fed protein-restricted diets may be higher due to increased protein catabolism in the muscle (Watford 2003), no differences in plasma urea concentrations were observed in this study. However, plasma creatinine levels, a waste product generated from muscle metabolism, increased in nitrogen-free diet-fed animals. A comparable increase in creatinine was previously observed in pigs fed nitrogen-free diets for 14 days due to increased muscle protein degradation (Van den Hemel-Grooten et al. 1998). Additionally, elevated plasma creatinine and liver enzymes AST and ALT, which are indicators of muscle damage, have been observed in cases of muscular dystrophy (Wang et al. 2017, 2021) and were numerically higher in pigs fed nitrogen-free diet. Thus, the lack of response in urea plasma concentrations may be because urea recycling in the gastrointestinal tract is increased during dietary protein deprivation, improving nitrogen utilization efficiency and minimizing losses (Fuller and Reeds 1998; Krone et al. 2019; Thacker et al. 1982).

The plasma concentrations of triglycerides, NEFA, and cholesterol were used to evaluate the lipo-metabolic status of the animals. A decrease in LDL plasma concentrations was observed in pigs consuming the nitrogen-free diet. The reason for the decrease in LDL concentrations in the current study is unclear. However, a high-carbohydrate intake in nitrogen-free diets could stimulate triglycerides and VLDL synthesis in the liver (van Zwol et al. 2024), which were numerically higher in pigs fed nitrogen-free diets. Additionally, a protein deficiency in the diet can decrease the synthesis of proteins associated with LDL production, such as ApoB 100, lipoprotein lipase or hepatic lipase (Kobayashi et al. 2015), leading to reduced LDL levels in the blood. Cholesterol is the primary lipid found in LDL, and its plasma levels are positively correlated (Feingold 2021). However, a reduction in cholesterol was not observed in pigs fed nitrogen-free diets, due to a compensatory increase in other lipid fractions such as VLDL and HDL. NEFA are released from lipolysis of triacylglycerol in response to energy needs (Henderson 2021), and since the diets provided adequate energy levels, no significant differences were observed in plasma concentrations of NEFA and glucose between diets. These results are consistent with previous research with protein- and amino acid-restricted pigs (Abeni et al. 2018; Regmi et al. 2018; Yang et al. 2021), suggesting that short-term protein restriction did not affect energy and lipid metabolism. However, previous studies with protein- or amino acid-restricted pigs have shown changes in carbohydrate and lipid metabolism as a result of excess energy (Goodarzi et al. 2023; Spring et al. 2020; Yu, Zhu, and Hang 2019).

Although using highly digestible proteins to estimate the BEL of amino acids is an alternative for mitigating the metabolic consequences of nitrogen-free diet, it has been observed that the BEL of proteins is higher when the casein method is used

(Jansman et al. 2002; Adeola et al. 2016). However, no differences in the BEL of proteins were observed in the current study. The lack of difference could be attributed to an increase in non-protein nitrogen in the GIT of pigs fed nitrogen-free diet, as approximately 30% of the nitrogen in the ileal digesta is composed of nucleic acids, urea and ammonia, and its concentration can increase owing to protein restriction (Chung and Baker 1992; Thacker et al. 1982). This is consistent with the findings observed for plasma urea concentrations, where no effects were observed, probably because of the GIT's increased recycling of non-protein nitrogen to minimize losses.

The BEL of amino acids determined by the nitrogen-free diet and casein diets were within the range of values reported in previous studies, except for threonine, which was decreased in both diets, and proline and glycine in pigs fed the nitrogen-free diet (Adeola et al. 2016; Brestenský, Nitrayová, and Patráš 2017; Deglaire, Moughan, and Tomé 2019; Kim et al. 2009; Mariscal-Landín and Reis de Souza 2006; Park and Adeola 2020; Zhang et al. 2002). Ileal endogenous amino acid losses are higher in pigs fed the casein diets compared to nitrogen-free diets, except for proline, which increases with nitrogen-free diets (Jansman et al. 2002; Ravindran 2021). However, this study found no differences in the BEL of proline, which is consistent with previous reports (Mariscal-Landín and Reis de Souza 2006; Park and Adeola 2020; Zhang et al. 2002). Increased proline levels in the ileal digesta of pigs fed a nitrogen-free diet have been associated with increased muscle protein degradation (de Lange, Sauer, and Souffrant 1989). Glutamine and alanine account for 50% of the amino acids released during muscle protein degradation (Zhang et al. 2002). In the small intestine, glutamine is metabolized to glutamic acid, ammonia, citrulline and proline, increasing proline concentration in the ileal digesta (Stein et al. 1999). The washout period between experimental periods could have prevented changes in the BEL of proline, as the BEL of proline increased during prolonged periods of low-protein feeding (Adedokun, Dong, and Harmon 2019; Mariscal-Landín and Reis de Souza 2006). Additionally, an increase in endogenous proline in the gastrointestinal tract has also been associated with an increase in mucin secretions as a physiological adaptation of pigs to diet (Cappai et al. 2013). Some authors have associated the elevated proline in the ileal digesta of animals fed nitrogen-free diets with the high carbohydrate content in these diets, which may stimulate mucin synthesis (Adedokun, Dong, and Harmon 2019; Barua et al. 2021; Zhou et al. 2022). On the other hand, protein deficiency in the diet has been associated with a decrease in the synthesis and secretion of mucins (Duangnumsaeng et al. 2021). Therefore, novel approaches should be used to identify the proteins that give rise to the amino acids in the ileal digesta (Ávila-Arres et al. 2024).

Proline is the most abundant amino acid in the ileal digesta collected from pigs fed the nitrogen-free diet, while glutamic acid is the most abundant in pigs fed the casein diet (Ravindran 2021), which is consistent with the findings of this study. The most abundant amino acids in the ileal digesta are glutamic acid, aspartic acid, threonine, proline, serine and glycine. The basal endogenous losses of glutamic acid, aspartic acid, serine, glycine, histidine, threonine, alanine, tyrosine, valine and isoleucine were higher in pigs consuming the

casein diet than they were in pigs fed nitrogen-free diet. The increase of some amino acids in the ileal digesta in pigs fed a casein diet is likely due to undigested amino acids from casein (Adeola et al. 2016). Pigs fed the casein diet showed an increase in the BEL of most amino acids, consistent with other studies (Zhang et al. 2002). However, in the study by Zhang et al. (2002), the level of casein in the diet was lower than that used in this study (5% vs. 18%). Other studies with low levels of casein in the diet have observed an increase in the BEL of only glutamic acid, serine and isoleucine compared to those fed nitrogen-free diet (Brestenský, Nitrayová, and Patráš 2017; Park and Adeola 2020). Because glutamic acid is the most abundant amino acid in casein, it has been suggested that the increase in glutamic acid in the ileal digesta of pigs fed casein diets is due to the incomplete digestion of casein (Park and Adeola 2020). However, glutamic acid, aspartic acid, serine, proline, glycine, alanine, threonine and branched chained amino acids are the most abundant amino acids in digestive enzymes and mucoproteins (Chung and Baker 1992; Macelline et al. 2021; Ravindran et al. 2008). Several studies have found that animals fed high-protein diets have increased pancreatic production of trypsin, chymotrypsin, lipase and amylase compared to animals fed low-protein diets (Fisinin et al. 2017; He et al. 2016; Kurz and Seifert 2021). Furthermore, feeding high-starch and dextrose diets can stimulate mucin secretion, which depends on dietary glutamic acid and glucose (Zhou et al. 2022). The most abundant amino acids in the glycosylated region of mucin are threonine, serine and proline, whereas glutamic acid, glycine and aspartic acid are the most abundant amino acids in the non-glycosylated region (Miner-Williams et al. 2012). Therefore, an increase in these amino acids in the ileal digesta of pigs fed casein diet could be attributed to the increased secretion of digestive enzymes and mucin. Mucin secretion is also stimulated by an increased number of bacteria in the intestine (Modina et al. 2021), which could be stimulated by the presence of proteins in the casein diet (Macelline et al. 2021). This could explain the increased ileal digesta of tyrosine (Dai, Wu, and Zhu 2011). Tyrosine and histidine are amino acid precursors of polyamines that are important for bacterial growth and proliferation (Zhao et al. 2018).

5 | Conclusions

In conclusion, this study provided insight into the metabolic implications of nitrogen-free diets and casein diets on the determination of basal ileal endogenous losses of amino acids. The findings indicated no significant effects on energy or lipid metabolism in pigs fed nitrogen-free diets. However, there was a decrease in plasma albumin and an increase in creatinine, suggesting adaptative and transient metabolic changes during the period of protein restriction. These changes could negatively impact the secretion of endogenous proteins in the gastrointestinal tract, as the majority of the basal ileal endogenous losses of amino acids in pigs fed nitrogen-free diets were lower than those in pigs fed casein diets. More research is needed to establish the relationship between the metabolic state and the estimation of basal endogenous losses of amino acids. Future studies should consider evaluating intermediate metabolites to elucidate the metabolic pathways involved in

animal adaptation to the diet and their effects on endogenous secretions.

Author Contributions

G.M.L. and T.C.R.S. conceived and designed the study. I.E.A.A. conducted the experiment. I.E.A.A. and E.R.R. conducted the lab analysis. I.E.A.A. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-México) for financially supporting the Research Project SIGI, No. 13202534765.

Ethics Statement

The experiment was performed under protocols approved by the Institutional Committee for Care and Use of Experimental Animals (Protocol number: SICUA.E.DC-2021/2-2) of the National Autonomous University of Mexico (UNAM).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

Data are available on request from the authors.

References

- Abeni, F., F. Petrerá, A. Dal Prà, L. Rapetti, G. M. Crovetto, and G. Galassi. 2018. "Blood Parameters in Fattening Pigs From Two Genetic Types Fed Diet With Three Different Protein Concentrations." *Translational Animal Science* 2, no. 4: 372–382. <https://doi.org/10.1093/tas/txy069>.
- Adedokun, S. A., K. Dong, and D. L. Harmon. 2019. "Evaluating the Effects of Adaptation Length, Dietary Electrolyte Balance, and Energy Source on Ileal Endogenous Amino Acid Losses in Pigs Fed Nitrogen-Free Diets." *Canadian Journal of Animal Science* 99, no. 3: 532–541. <https://doi.org/10.1139/cjas-2018-0124>.
- Adeola, O., P. C. Xue, A. J. Cowieson, and K. M. Ajuwon. 2016. "Basal Endogenous Losses of Amino Acids in Protein Nutrition Research for Swine and Poultry." *Animal Feed Science and Technology* 221: 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.004>.
- Association of Official Analytical Chemists. 2000. *Official Methods of Analysis*, 17th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.
- Ávila-Arres, I. E., E. Rodríguez Hernández, S. Gómez Rosales, T. C. Reis de Souza, and G. Mariscal-Landín. 2024. "Proteomic Identification and Quantification of Basal Endogenous Proteins in the Ileal Digesta of Growing Pigs." *Animals* 14, no. 13: 2000. <https://doi.org/10.3390/ani14132000>.
- Barua, M., M. R. Abdollahi, F. Zaefarian, et al. 2021. "Basal Ileal Endogenous Amino Acid Flow in Broiler Chickens as Influenced by Age." *Poultry Science* 100, no. 11: 101480. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101269>.
- Bertholf, R. L. 2014. "Proteins and Albumin." *Laboratory Medicine* 45, no. 1: e25–e41. <https://doi.org/10.1309/LMKRNRGW5J03APZQ>.
- Brestenský, M., S. Nitrayová, and P. Patrás. 2017. "Ileal Endogenous Losses in Pigs Feeding a Protein-Free Diet or Diets With Different Contents of Casein or Crystalline Amino Acids." *Archives of Animal Nutrition* 71, no. 3: 210–218. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2017.1312832>.

Busher, J. 1990. "Serum Albumin and Globulin." In *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, edited by H. K. Walker, W. D. Hall, and J. W. Hurst, 3rd ed. Boston, MA: Butterworths.

Butts, C. A., P. J. Moughan, W. C. Smith, and D. H. Carr. 1993. "Endogenous Lysine and Other Amino Acid Flows at the Terminal Ileum of the Growing Pig (20 kg Bodyweight): The Effect of Protein-Free, Synthetic Amino Acid, Peptide and Protein Alimentation." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61: 31–40.

Camp Montoro, J., D. Solà-Oriol, R. Muns, J. Gasa, N. Llanes, and E. G. Manzanilla. 2022. "Blood and Faecal Biomarkers to Assess Dietary Energy, Protein and Amino Acid Efficiency of Utilization by Growing and Finishing Pigs." *Porcine Health Management* 8, no. 1: 32. <https://doi.org/10.1186/s40813-022-00273-y>.

Cappai, M. G., P. Wolf, W. Pinna, and J. Kamphues. 2013. "Pigs Use Endogenous Proline to Cope With Acorn (*Quercus pubescens* Willd.) Combined Diets High in Hydrolysable Tannins." *Livestock Science* 155, no. 2–3: 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.05.003>.

Caso, G., J. Feiner, I. Mileva, et al. 2007. "Response of Albumin Synthesis to Oral Nutrients in Young and Elderly Subjects." *American Journal of Clinical Nutrition* 85, no. 2: 446–451. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.2.446>.

Chen, Y., M. Michalak, and L. B. Agellon. 2018. "Importance of Nutrients and Nutrient Metabolism on Human Health." *Yale Journal of Biology and Medicine* 91, no. 2: 95–103.

Chung, T. K., and D. H. Baker. 1992. "Apparent and True Amino Acid Digestibility of a Crystalline Amino Acid Mixture and of Casein: Comparison of Values Obtained With Ileal-Cannulated Pigs and Cecotomized Cockerels." *Journal of Animal Science* 70: 3781–3790.

Dai, Z.-L., G. Wu, and W.-Y. Zhu. 2011. "Amino Acid Metabolism in Intestinal Bacteria: Links Between Gut Ecology and Host Health." *Frontiers in Bioscience* 16, no. 1: 1768. <https://doi.org/10.2741/3820>.

Deglaire, A., P. J. Moughan, and D. Tomé. 2019. "A Casein Hydrolysate Does Not Enhance Ileal Endogenous Protein Flows Compared With the Parent Intact Casein When Fed to Growing Pigs." *Current Developments in Nutrition* 3, no. 2: nzy083. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzy083>.

Diario Oficial de la Federación. August 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación.

Duangnumswang, Y., J. Zentek, F. Goodarzi Borojoni, et al. 2021. "Development and Functional Properties of Intestinal Mucus Layer in Poultry." *Frontiers in Immunology* 12: 745849. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.745849>.

Feingold, K. R. 2021. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext* [Internet], edited by K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, et al. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>.

Fisinin, V. I., V. G. Vertiprakhov, A. A. Grozina, and L. V. Khasanova. 2017. "Pancreatic Secretion and Intestinal Digestibility of Amino Acids in Chicken at Different Dietary Protein Level and Quality." *Agricultural Biology* 52, no. 2: 374–381. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.2.374eng>.

Fuller, M. F., and P. J. Reeds. 1998. "Nitrogen Cycling in the Gut." *Annual Review of Nutrition* 18: 385–411.

Garlick, P., M. McNurlan, and C. Patlak. 1999. "Adaptation of Protein Metabolism in Relation to Limits to High Dietary Protein Intake." Supplement, *European Journal of Clinical Nutrition* 53, no. S1: s34–s43. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600742>.

Goodarzi, P., M. Habibi, M. W. Gorton, et al. 2023. "Dietary Isoleucine and Valine: Effects on Lipid Metabolism and Ureaogenesis in Pigs Fed With Protein Restricted Diets." *Metabolites* 13, no. 1: 89. <https://doi.org/10.3390/metabo13010089>.

He, L., L. Wu, Z. Xu, et al. 2016. "Low-Protein Diets Affect Ileal Amino Acid Digestibility and Gene Expression of Digestive Enzymes in

- Growing and Finishing Pigs." *Amino Acids* 48, no. 1: 21–30. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2059-1>.
- Hellwing, A. L. F., A.-H. Tauson, and A. Skrede. 2007. "Blood Parameters in Growing Pigs Fed Increasing Levels of Bacterial Protein Meal." *Acta Veterinaria Scandinavica* 49, no. 1: 33. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-33>.
- Henderson, G. C. 2021. "Plasma Free Fatty Acid Concentration as a Modifiable Risk Factor for Metabolic Disease." *Nutrients* 13, no. 8: 2590. <https://doi.org/10.3390/nu13082590>.
- Henderson, J. H., R. D. Ricker, B. A. Bidlingmeyer, and C. Woodward. 2000. "Rapid, Accurate and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids. Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse AAA Columns and the Agilent 1100 HPLC." Agilent Technologies (Part No. 5980-1193E). <http://www.agilent.com/chem/supplies>.
- Institut National de la Recherche Agronomique. 1984. *L'Alimentation des Animaux Monogastriques: Porc, Lapin, Volailles*. Paris, France: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Jansman, A. J. M., W. Smink, P. van Leeuwen, and M. Rademacher. 2002. "Evaluation Through Literature Data of the Amount and Amino Acid Composition of Basal Endogenous Crude Protein at the Terminal Ileum of Pigs." *Animal Feed Science and Technology* 98: 49–60.
- Kim, B. G., G. I. Petersen, R. B. Hinson, G. L. Allee, and H. H. Stein. 2009. "Amino Acid Digestibility and Energy Concentration in a Novel Source of High-Protein Distillers Dried Grains and Their Effects on Growth Performance of Pigs." *Journal of Animal Science* 87, no. 12: 4013–4021. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2060>.
- Klem, T. B., E. Bleken, H. Morberg, S. I. Thoresen, and T. Framstad. 2010. "Hematologic and Biochemical Reference Intervals for Norwegian Crossbreed Grower Pigs." *Veterinary Clinical Pathology* 39: 221–226. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00199.x>.
- Kobayashi, J., K. Miyashita, K. Nakajima, and H. Mabuchi. 2015. "Hepatic Lipase: A Comprehensive View of Its Role on Plasma Lipid and Lipoprotein Metabolism." *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 22, no. 10: 1001–1011. <https://doi.org/10.5551/jat.31617>.
- Krone, J. E. C., A. K. Agyekum, M. ter Borgh, K. Hamonic, G. B. Penner, and D. A. Columbus. 2019. "Characterization of Urea Transport Mechanisms in the Intestinal Tract of Growing Pigs." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 317, no. 6: G839–G844. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00220.2019>.
- Kurz, A., and J. Seifert. 2021. "Factors Influencing Proteolysis and Protein Utilization in the Intestine of Pigs: A Review." *Animals* 11, no. 12: 3551. <https://doi.org/10.3390/ani11123551>.
- de Lange, C. F. M., W. C. Sauer, and W. Souffrant. 1989. "The Effect of Protein Status of the Pig on the Recovery and Amino Acid Composition of Endogenous Protein in Digesta Collected From the Distal Ileum." *Journal of Animal Science* 67: 755–762.
- Ma, X., Z. Tian, D. Deng, Y. Cui, and Y. Qiu. 2018. "Effect of Dietary Protein Level on the Expression of Proteins in the Gastrointestinal Tract of Young Pigs." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, no. 17: 4364–4372. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05655>.
- Macelline, S. P., P. V. Chrystal, S. Y. Liu, and P. H. Selle. 2021. "The Dynamic Conversion of Dietary Protein and Amino Acids Into Chicken-Meat Protein." *Animals* 11, no. 8: 2288. <https://doi.org/10.3390/ani11082288>.
- Marín-García, P. J., L. Llobat, M. C. López-Lujan, M. Cambra-López, E. Blas, and J. J. Pascual. 2022. "Urea Nitrogen Metabolite Can Contribute to Implementing the Ideal Protein Concept in Monogastric Animals." *Animals* 12, no. 18: 2344. <https://doi.org/10.3390/ani12182344>.
- Mariscal-Landín, G., and T. C. Reis de Souza. 2006. "Endogenous Ileal Losses of Nitrogen and Amino Acids in Pigs and Piglets Fed Graded Levels of Casein." *Archives of Animal Nutrition* 60: 454–466. <https://doi.org/10.1080/17450390600973642>.
- McNurlan, M. A., A. M. Tomkins, and P. J. Garlick. 1979. "The Effect of Starvation on the Rate of Protein Synthesis in Rat Liver and Small Intestine." *Biochemical Journal* 178, no. 2: 373–379. <https://doi.org/10.1042/bj1780373>.
- Mehrotra, D. V. 2014. "A Recommended Analysis for 2 × 2 Crossover Trials With Baseline Measurements." *Pharmaceutical Statistics* 13, no. 6: 376–387. <https://doi.org/10.1002/pst.1638>.
- Miner-Williams, W., A. Deglaire, R. Benamouzig, M. F. Fuller, D. Tomé, and P. J. Moughan. 2012. "Endogenous Proteins in Terminal Ileal Digesta of Adult Subjects Fed a Casein-Based Diet." *American Journal of Clinical Nutrition* 96, no. 3: 508–515. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.033472>.
- Modina, S. C., L. Aidos, R. Rossi, P. Pocar, C. Corino, and A. Di Giancamillo. 2021. "Stages of Gut Development as a Useful Tool to Prevent Gut Alterations in Piglets." *Animals* 11, no. 5: 1412. <https://doi.org/10.3390/ani11051412>.
- Moughan, P. J., W. B. Souffrant, and S. M. Hodgkinson. 1998. "Physiological Approaches to Determining Gut Endogenous Amino Acid Flows in the Mammal." *Archiv fur Tierernahrung* 51: 237–252.
- Myers, W. D., P. A. Ludden, V. Nayjighugu, and B. W. Hess. 2004. "Technical Note: A Procedure for the Preparation and Quantitative Analysis of Samples for Titanium Dioxide." *Journal of Animal Science* 82: 179–183.
- National Research Council. 2012. *Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition*. Washington, DC: National Academies Press.
- Nyachoti, C. M., C. F. M. Lange, B. W. McBride, and H. Schulze. 1997. "Significance of Endogenous Gut Nitrogen Losses in the Nutrition of Growing Pigs: A Review." *Canadian Journal of Animal Science* 77: 149–163.
- Park, C. S., and O. Adeola. 2020. "Basal Ileal Endogenous Losses of Amino Acids in Pigs Determined by Feeding Nitrogen-Free Diet or Low-Casein Diet or by Regression Analysis." *Animal Feed Science and Technology* 267: 114550. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114550>.
- Ravindran, V. 2021. "Progress in Ileal Endogenous Amino Acid Flow Research in Poultry." *Journal of Animal Science and Biotechnology* 12: 5. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00526-2>.
- Ravindran, V., P. C. H. Morel, S. M. Rutherford, and D. V. Thomas. 2008. "Endogenous Flow of Amino Acids in the Avian Ileum as Influenced by Increasing Dietary Peptide Concentrations." *British Journal of Nutrition* 101, no. 6: 822–828. <https://doi.org/10.1017/S0007114508039974>.
- Regmi, N., T. Wang, M. A. Crenshaw, B. J. Rude, and S. F. Liao. 2018. "Effects of Dietary Lysine Levels on the Concentrations of Selected Nutrient Metabolites in Blood Plasma of Late-Stage Finishing Pigs." *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 102, no. 2: 403–409. <https://doi.org/10.1111/jpn.12714>.
- Reis de Souza, T. C., B. B. Mar, and G. Mariscal-Landín. 2000. "Canulación de cerdos postdestete para pruebas de digestibilidad ileal: Desarrollo de una metodología." *Técnica Pecuaria en México* 38: 143–150.
- Sarri, L., J. Balcells, A. R. Seradj, and G. de la Fuente. 2024. "Protein Turnover in Pigs: A Review of Interacting Factors." *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 108, no. 2: 451–469. <https://doi.org/10.1111/jpn.13906>.
- SAS Version 9.2. 2008. *Statistical Analysis Systems Institute User's Guide (Version 9.2)*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Spring, S., H. Premathilake, U. De Silva, C. Shili, S. Carter, and A. Pezeshki. 2020. "Low Protein-High Carbohydrate Diets Alter Energy Balance, Gut Microbiota Composition and Blood Metabolomics Profile in Young Pigs." *Scientific Reports* 10, no. 1: 3318. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60150-y>.
- Stein, H. H., B. Sève, M. F. Fuller, P. J. Moughan, and C. F. M. de Lange. 2007. "Invited Review: Amino Acid Bioavailability and Digestibility in Pig Feed Ingredients: Terminology and Application." *Journal of Animal Science* 85: 172–180.

- Stein, H. H., N. L. Trotter, C. Bellaver, and R. A. Easter. 1999. "The Effect of Feeding Level and Physiological Status on Total Flow and Amino Acid Composition of Endogenous Protein at the Distal Ileum in Swine." *Journal of Animal Science* 77: 1180–1187.
- Thacker, P. A., J. P. Bowland, L. P. Milligan, and E. Weltzien. 1982. "Effects of Graded Dietary Protein Levels on Urea Recycling in the Pig." *Canadian Journal of Animal Science* 62, no. 4: 1193–1197. <https://doi.org/10.4141/cjas82-139>.
- Tian, Z., X. Ma, D. Deng, Y. Cui, and W. Chen. 2019. "Influence of Nitrogen Levels on Nutrient Transporters and Regulators of Protein Synthesis in Small Intestinal Enterocytes of Piglets." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67, no. 10: 2782–2793. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06712>.
- Tian, Z., X. Ma, X. Yang, et al. 2016. "Influence of Low Protein Diets on Gene Expression of Digestive Enzymes and Hormone Secretion in the Gastrointestinal Tract of Young Weaned Piglets." *Journal of Zhejiang University-Science B* 17, no. 10: 742–751. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600229>.
- Van den Hemel-Grooten, H. N. A., G. J. Garssen, V. V. A. M. Schreurs, H. C. M. Peijnenburg, and M. W. A. Verstegen. 1998. "Chemical Composition of Body Compartments and Plasma Parameters After Protein-Free Feeding and Realimentation in Growing Pigs." *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 79, no. 1–5: 162–173. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1998.tb00640.x>.
- van Zwol, W., B. van de Sluis, H. N. Ginsberg, and J. A. Kuivenhoven. 2024. "VLDL Biogenesis and Secretion: It Takes a Village." *Circulation Research* 134, no. 2: 226–244. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.323284>.
- Wang, J., Y. Xiao, J. Li, M. Qi, and B. Tan. 2021. "Serum Biochemical Parameters and Amino Acids Metabolism Are Altered in Piglets by Early-Weaning and Proline and Putrescine Supplementations." *Animal Nutrition* 7, no. 2: 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.007>.
- Wang, L., M. Chen, R. He, et al. 2017. "Serum Creatinine Distinguishes Duchenne Muscular Dystrophy From Becker Muscular Dystrophy in Patients Aged ≤ 3 Years: A Retrospective Study." *Frontiers in Neurology* 8: 196. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00196>.
- Watford, M. 2003. "The Urea Cycle: Teaching Intermediary Metabolism in a Physiological Setting." *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31, no. 5: 289–297. <https://doi.org/10.1002/bmb.2003.494031050249>.
- Wu, G. 2013. "Functional Amino Acids in Nutrition and Health." *Amino Acids* 45, no. 3: 407–411. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1500-6>.
- Wykes, L. J., M. Fiorotto, D. G. Burrin, et al. 1996. "Chronic Low Protein Intake Reduces Tissue Protein Synthesis in a Pig Model of Protein Malnutrition." *Journal of Nutrition* 126, no. 5: 1481–1488. <https://doi.org/10.1093/jn/126.5.1481>.
- Yang, Z., M. S. Hasan, R. M. Humphrey, J. K. Htoo, and S. F. Liao. 2021. "Changes in Growth Performance, Plasma Metabolite Concentrations, and Myogenic Gene Expression in Growing Pigs Fed a Methionine-Restricted Diet." *Frontiers in Bioscience-Landmark* 26, no. 9: 413. <https://doi.org/10.52586/4956>.
- Yu, D., W. Zhu, and S. Hang. 2019. "Effects of Low-Protein Diet on the Intestinal Morphology, Digestive Enzyme Activity, Blood Urea Nitrogen, and Gut Microbiota and Metabolites in Weaned Pigs." *Archives of Animal Nutrition* 73, no. 4: 287–305. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2019.1614849>.
- Zhang, Y., D. Li, S. Fan, X. Piao, J. Wang, and I. K. Han. 2002. "Effects of Casein and Protein-Free Diets on Endogenous Amino Acid Losses in Pigs." *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 15: 1634–1638.
- Zhao, J., X. Zhang, H. Liu, M. A. Brown, and S. Qiao. 2018. "Dietary Protein and Gut Microbiota Composition and Function." *Current Protein & Peptide Science* 20, no. 2: 145–154. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180514145437>.
- Zhou, H., W. Wu, T. Mahmood, et al. 2022. "Comparison of Endogenous Amino Acid Losses in Broilers When Offered Nitrogen-Free Diets With Differing Ratios of Dextrose to Corn Starch." *Scientific Reports* 12, no. 1: 5689. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09744-7>.

8. ARTÍCULO 2

Identificación y cuantificación proteómica de las proteínas endógenas en la digesta ileal de cerdos en crecimiento.

Proteomic Identification and Quantification of Endogenous Proteins in the Ileal Digesta of Growing Pigs.

Iris Elisa Avila Arres¹, Elba Rodríguez Hernández², Sergio Gómez Rosales², Tércia Cesária Reis de Souza³, Gerardo Mariscal-Landín^{2*}

¹ Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México; elisaaa_2388@oulook.com

² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP, Km 1 carretera a Colón, Querétaro.

³ Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Maestría en Salud y Producción Ani-mal Sustentable. Av. De las Ciencias s/n. Querétaro, Querétaro, México; terci@uaq.mx

Artículo enviado a: *Animals*

Article

Proteomic Identification and Quantification of Basal Endogenous Proteins in the Ileal Digesta of Growing Pigs

Iris Elisa Ávila-Arres¹, Elba Rodríguez Hernández², Sergio Gómez Rosales², Tércia Cesária Reis de Souza³ and Gerardo Mariscal-Landín^{2,*}

¹ Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; iris_eaa@comunidad.unam.mx

² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP, Km 1 Carretera a Colón, Querétaro 76280, Mexico; rodriguez.elba@inifap.gob.mx (E.R.H.); gomez.sergio@inifap.gob.mx (S.G.R.)

³ Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Av. de las Ciencias s/n, Querétaro 76230, Mexico; tertia@uaq.mx

* Correspondence: mariscal.gerardo@inifap.gob.mx

Simple Summary: As variations in the determination of basal endogenous losses can affect the estimation of the nutritional value of diets, this study used a proteomics approach to identify the composition of endogenous proteins in the ileal digesta of growing pigs fed with a nitrogen-free diet and a casein diet. The nitrogen-free diet increased the expression of proteins related to intestinal inflammation, the activation of innate antimicrobial host defense, cellular autophagy, and epithelial turnover in the ileal digesta. In contrast, the casein diet increased the proteins related to pancreatic and intestinal digestive secretions. These findings suggest that a casein diet could provide a more accurate estimation of basal endogenous losses.



Citation: Ávila-Arres, I.E.; Rodríguez Hernández, E.; Gómez Rosales, S.; Reis de Souza, T.C.; Mariscal-Landín, G. Proteomic Identification and Quantification of Basal Endogenous Proteins in the Ileal Digesta of Growing Pigs. *Animals* 2024, 14, 2000. <https://doi.org/10.3390/ani14132000>

Academic Editors: Manuel Gonzalez-Ronquillo, Marta I. Miranda Castañón and Einar Vargas-Bello-Pérez

Received: 27 May 2024

Revised: 28 June 2024

Accepted: 2 July 2024

Published: 7 July 2024



Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The accurate estimation of basal endogenous losses (BEL) of amino acids at the ileum is indispensable to improve nutrient utilization efficiency. This study used a quantitative proteomic approach to identify variations in BEL in the ileal digesta of growing pigs fed a nitrogen-free diet (NFD) or a casein diet (CAS). Eight barrow pigs (39.8 ± 6.3 kg initial body weight (BW)) were randomly assigned to a 2×2 crossover design. A total of 348 proteins were identified and quantified in both treatments, of which 101 showed a significant differential abundance between the treatments ($p < 0.05$). Functional and pathway enrichment analyses revealed that the endogenous proteins were associated with intestinal metabolic function. Furthermore, differentially abundant proteins (DAPs) in the digesta of pigs fed the NFD enriched terms and pathways that suggest intestinal inflammation, the activation of innate antimicrobial host defense, an increase in cellular autophagy and epithelial turnover, and reduced synthesis of pancreatic and intestinal secretions. These findings suggest that casein diets may provide a more accurate estimation of BEL because they promote normal gastrointestinal secretions. Overall, proteomic and bioinformatic analyses provided valuable insights into the composition of endogenous proteins in the ileal digesta and their relationship with the functions, processes, and pathways modified by diet composition.

Keywords: proteomics; basal endogenous losses; pigs; nitrogen-free diet; casein diet

1. Introduction

Standardized ileal digestibility (SID) values of amino acids are commonly used to improve nutrient utilization efficiency [1,2]. Calculating SID values requires the determination of the amino acid basal endogenous losses (BEL) [3]. Regardless of the dietary composition or feeding conditions, the gastrointestinal tract constantly synthesizes and

secretes proteins into the intestinal lumen for the digestion and absorption of dietary components, which also acts as the first line of immune defense in the intestine [4]. These endogenous secretions, including saliva, bile, gastric, pancreatic, and intestinal secretions, as well as mucoproteins, intestinal epithelial cell shedding, bacterial proteins, and plasma proteins [5,6], are quantitatively greater than those of dietary origin [7,8]. Approximately 60–80% of the proteins secreted into the intestinal lumen are digested and reabsorbed [8], whereas the non-reabsorbed amino acids from endogenous proteins are quantified at the end of the ileum of pigs to estimate the endogenous losses of amino acids [9]. In pigs, BELs of amino acids are typically determined by feeding them a nitrogen-free diet (NFD) or a diet containing highly digestible protein [10–15]. However, while these methodologies determine the BEL of amino acids and allow for the standardization of ileal digestibility values, discrepancies in method selection arise because of variations in the estimated endogenous amino acids, which can affect the accuracy of estimating the nutritional value of dietary ingredients [3,16].

Furthermore, these methodologies do not provide information on the origin of the endogenous nitrogen responsible for the variations in amino acids found in the ileal flow, making it challenging to explain inconsistencies between methodologies or within the same method. Although previous studies have identified and quantified the sources of endogenous secretions leading to the amino acids found in the ileal digesta using different methodologies [4,17,18], these methodologies can be costly or challenging to implement routinely [6,19].

With advances in biotechnology, proteomic approaches based on mass spectrometry (MS) have emerged. These approaches allow the identification and quantification of numerous proteins of endogenous origin and the assessment of the impact of different dietary factors on intestinal secretions, even without prior knowledge of the proteins present in the sample [20]. This study aimed to use proteomics to identify and quantify endogenous proteins secreted in the intestine and those remaining in the ileal digesta of pigs fed an NFD and a diet containing highly digestible proteins. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed on the identified proteins to elucidate their functions and metabolic pathways associated with the variations in basal endogenous losses observed with different diets, which will provide a better understanding of the response of intestinal physiology to diet.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design and Collection of Digesta Samples

The Institutional Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the UNAM approved the animal experimental procedures (Protocol SICUAE.DC-2021/2-2). The committee adhered to the guidelines of the Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1999) [21] and the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals [22].

Eight barrows (GP8 × Fertilis, PIC) with an initial body weight (BW) of 39.8 ± 6.3 kg were surgically implanted with a T cannula in the distal ileum [23]. The pigs were individually housed in metabolic cages with slat floors (0.80 m²) equipped with a feeder and a nipple drinker. The cages were kept in a room with a controlled temperature (22–24 °C) and natural light. The pigs were randomly allocated to the AB ($n = 4$) or BA ($n = 4$) sequence in a 2×2 crossover design. In the AB sequence, pigs received the nitrogen-free diet (NFD) in period 1 and the casein diet (CAS) in period 2, while in the BA sequence, pigs received CAS in period 1 and the NFD in period 2; there were a total of 8 observations per treatment. Each experimental period lasted seven days, with a seven-day washout interval between experimental periods to enable the animals to return to their normal metabolic state before starting the next period. Table 1 shows the composition and nutrient content of the experimental diets. Titanium dioxide was added to the diets as a digestibility marker. (Ileal digestibility data not present.) The experimental diets were balanced in nutrients, except protein, to meet the nutrient recommendations for growing pigs [24].

Feeding was restricted to 2.5 times the digestible energy requirement for maintenance of 110 kcal/kg BW^{0.75} [25]. Feed was provided twice daily, and the pigs had ad libitum access to water throughout the experiment. Digesta samples were collected for 12 h on days six and seven of each period using plastic bags tied to the cannula cylinder [26]. At the end of the collection, the samples from each pig and each period were homogenized, and a 50 mL aliquot was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for proteomic analyses.

Table 1. Composition and nutrient content of experimental diets.

	NFD ¹	CAS
Ingredients, g/kg		
Cornstarch	795.4	615.4
Casein		180
Dextrose	100	100
Soybean oil	30	30
Cellulose	40	40
Calcium carbonate	5	5
Orthophosphate	19	19
Salt	4	4
Potassium bicarbonate	0.5	0.5
Magnesium oxide	0.1	0.1
Titanium dioxide	4	4
Vitamin mineral premix ²	2	2
Calculated nutrient content		
Metabolizable energy, Kcal, Kg	3481	3473
Crude protein, %	0	16
Crude fiber, %	2.86	2.83

¹ NFD = nitrogen-free diet, CAS = casein diet; ² provided per kilogram of diet: Co 0.42 mg, Cu 8.4 mg, Fe 70 mg, I 0.56 mg, Mn 21 mg, Se 0.18 mg, Zn 84 mg, vitamin A 10, 1000 IU, vitamin D3 2000 IU, vitamin E 120 mg, vitamin K 8 mg, thiamine 0.35 mg, riboflavin 10 mg, pyridoxine 6 mg, cyanocobalamin 0.05 mg, niacin 60 mg, pantothenic acid 35 mg, folic acid 1.5 mg, and biotin 0.3 mg.

2.2. Proteomic Analysis of the Ileal Digesta

The ileal digesta samples were thawed ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), homogenized, and centrifuged at 3000 rpm for 3 min. Supernatants were collected after centrifugation and the protein concentration of each sample was determined using a Bradford Protein Assay Quick Start kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and a bovine serum albumin standard curve. Three technical replicates for each treatment were used for proteomic analyses to reduce individual variation. For the technical replicates, equimolar proteins from the supernatant of each digesta sample were pooled per treatment and divided into three equal parts ($n = 3$) [27]. The supernatant proteins were precipitated with methanol–chloroform, and the resulting pellets were enzymatically digested using the iST Sample Preparation iST[®] kit (PreOmics, Munich, Germany) according to the protocol established by the manufacturer. The resulting peptides were dried using a Savant DNA120 SpeedVac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and then resuspended with “LC-load” reagent (PreOmics, Munich, Germany). An aliquot of 2.5 μL from a stock of alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) from *Saccharomyces cerevisiae* (Uniprot, accession number P00330; 1 pmol/ μL) was added as an internal standard to each sample to obtain a final concentration of 25 fmol/ μL (final volume of 100 μL). Finally, samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until LC-MS analysis.

Label-free identification and quantification by MS was carried out using the methodology described by Rios-Castro [28], with some modifications; briefly, tryptic peptides were separated on an HSS T3 C18 column (Waters, Milford, MA, USA; 75 $\mu\text{m} \times 150\text{ mm}$, 100 \AA pore size, 1.8 μm particle size) using a UPLC ACQUITY M-Class with mobile phase A (0.1% formic acid (FA) in H_2O) and mobile phase B (0.1% FA in acetonitrile (ACN)) under the gradient 0 min 7% B, 121.49 min 40% B, 123.15 to 126.46 min 85% B, and 129 to 130 min 7% B, at a flow of 400 nL $\cdot\text{min}^{-1}$ and $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. The spectrum data were acquired in a Synapt G2-Si mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) using nano electrospray ionization

and ion mobility separation (IM-MS) using a data-independent acquisition (DIA) approach through High-Definition Multiplexed MS/MS (HDMS^E) mode. For the ionization source, parameters were set with the following values: 2.75 kV in the sampling capillary, 30 V in the sampling cone, 30 V in the source offset, 70 °C for the source temperature, 0.5 bar for the nanoflow gas, and 150 L·h⁻¹ for the purge gas flow. Two chromatograms were acquired (low- and high-energy chromatograms) in positive mode in a range of m/z 50–2000 with a scan time of 500 ms. No collision energy was applied to obtain the low-energy chromatograms, while for the high-energy chromatograms, the precursor ions were fragmented in the transfer cell using a collision energy ramp from 19 to 55 eV.

The data generated in the mass spectrometer in *.raw format were analyzed and quantified using the Progenesis Q1 v3.0.3 proteomics software (Waters, Milford, CT, USA) against the *Sus scrofa* reference database downloaded from UNIPROT (<https://www.uniprot.org/> accessed on 31 January 2023). Sequences were concatenated in reverse sense in the same *.Fasta file used to apply the target-decoy strategy to deliver false-positive estimations. The parameters for the protein identification were trypsin as the cutting enzyme and one missed cleavage site allowed; carbamidomethyl (C) as fixed modification; and oxidation (M), amidation (C-terminal), desamidation (Q, N), and phosphorylation (S, T, Y) as variable modifications. Fragment mass tolerance was set to 20 ppm and 10 ppm for peptides. The protein false discovery rate was set to <1%. All false-positive identifications (reversed proteins) and proteins with 1 peptide identified were discarded for subsequent analysis. Protein quantification was performed using the Top3 method. This method quantifies proteins by averaging the spectrometric signal of the three most intense tryptic peptides of each protein for quantification [29].

2.3. Statistical and Bioinformatic Analysis

Statistical analyses and data visualization were performed using normalized protein quantification values for each protein. A one-way ANOVA was used to perform the significance test to determine differences in protein abundance between treatments. Fold change (FC) was calculated as the CAS/NFD ratio. Proteins with a p -value < 0.05 and \log_2 FC greater than 0.5 or less than -0.5 were considered differentially abundant proteins (DAP). A heatmap and volcano plot were generated using the R v.4.2.2 software (<http://www.R-project.org> accessed on 2 June 2023). GO (<http://geneontology.org/> accessed on 2 June 2023) and KEGG pathway (<http://www.genome.jp/kegg/> accessed on 2 June 2023) enrichment analyses were performed to assess the functions and biological pathways associated with the proteins identified in the digesta using the online platform ShinyGO against the *Sus scrofa* database [30]. The GO terms and KEGG pathways were considered significantly enriched with a p -value < 0.05, corrected by FDR (FDR < 0.05). GO enrichment analysis was used to classify the proteins into biological processes (BPs), cellular components (CCs), and molecular functions (MFs).

3. Results

3.1. Proteomic Characterization of Endogenous Proteins in the Ileal Digesta

In total, 348 endogenous proteins were identified and quantified in the ileal digesta. Table 2 shows the 20 most abundant endogenous proteins found in the ileal digesta. These proteins accounted for approximately 40% of the endogenous proteins identified in the ileal digesta of growing pigs fed the NFD or CAS diets. A complete list of the identified proteins is provided in Supplementary Material Table S1.

GO and KEGG enrichment analyses were performed using the 348 identified proteins. The top 20 GO terms enriched for BPs, CCs, and MFs are shown in Figure 1. Additionally, the proteins identified in pig digesta significantly enriched eight KEGG pathways (Figure 1D). GO terms and KEGG pathways were associated with the maintenance of gut epithelium and function. A list of the proteins in each GO term and KEGG pathway is available in the Supplementary Material Table S2.

Table 2. Top 20 most abundant endogenous proteins in the digesta.

Accession	GEN	Protein Name	TOP NFD	TOP CAS
P01846		Ig lambda chain C region	1	1
P00761		Trypsin	2	2
A0A287A042	MGAM	Maltase-glucoamylase	5	4
P09955	CPB1	Carboxypeptidase B	6	3
P08419	CELA2A	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	3	10
A0A5G2QEP8	LRR1Q3	Leucine-rich repeats and IQ motif containing 3	4	11
K7GMF9	ANPEP	Aminopeptidase	7	6
A0A5G2RGB6	MEP1B	Meprin A subunit B	9	5
C6L245	try	Putative trypsinogen	11	7
A0A287AYJ2	ANXA4	Annexin A4	10	14
A0A287B626		IgA constant region	12	13
F1RRW5	ACE	Angiotensin-converting enzyme	16	8
P56729	SI	Sucrase-isomaltase intestinal	14	16
A0A287BPD6	MME	Nephrilysin	13	20
F1SUW2	CTRC	Chymotrypsin-C	15	
A0A5G2QAG3	LAP3	Cytosolic aminopeptidase	8	
P09954	CPA1	Carboxypeptidase A1	18	
A0A287AT48	LOC100153899	Alpha-1-antichymotrypsin 2		12
A0A5G2RDG3	NAALA DL1	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase like 1	17	
F1STN0	SMPDL3B	Sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3B		18
P80310	S100A12	Protein S100-A12		15
F1SCC9	LOC106504545	SERPIN domain-containing protein	20	
I3LHI7	LOC100621820	Peptidase S1 domain-containing protein		9
K7GMV8	ENPP3	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	19	
I3LCF8	CTRL	Chymotrypsin like		17
A0A286ZTL5	WDR31	WD repeat domain 31		19

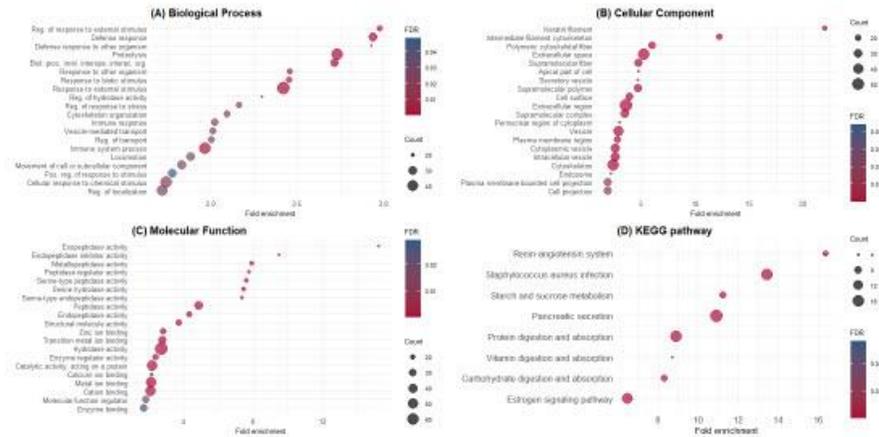


Figure 1. Gene Ontology and KEGG pathway enrichment analysis of ileal endogenous proteins. (A) Biological process; (B) cellular compartment; (C) molecular function; (D) KEGG pathways. The y-axis shows significantly enriched GO terms and pathways, whereas the x-axis denotes fold enrichment. The size of dots represents the number of genes within this term or pathway, and dots' colors represent the enrichment FDR.

3.2. Analysis of DAPs

Protein abundance analysis identified 101 DAPs between the NFD and CAS treatments. Figure 2 illustrates the changes in the abundance values of proteins and *p*-values using a volcano plot, and hierarchical clustering of the DAPs confirmed the presence of two distinct groups (Figure 3).

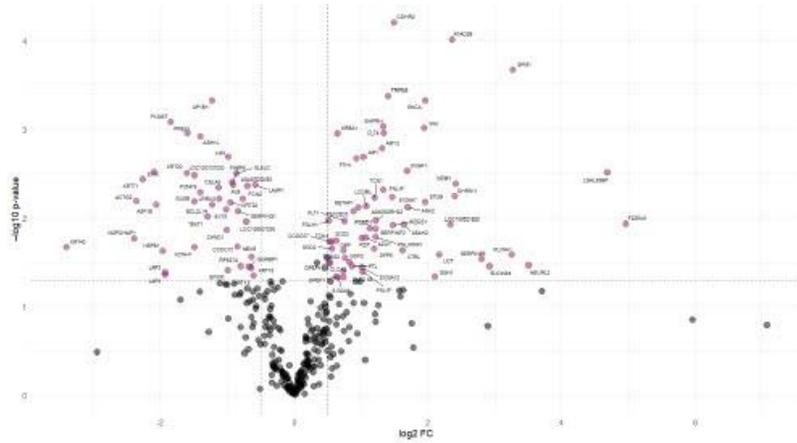


Figure 2. Volcano plot of differentially abundant proteins. Volcano plot representing each protein with a dot. The “x” axis represents the log₂ FC between CAS and NFD and the “y” axis represents the p-value (−log₁₀). The dashed lines indicate the significance limit in the p-value and FC. Gray dots represent proteins with non-significant changes in abundance. Colored dots represent proteins that significantly increase (right) or decrease (left) their abundance in the digesta of pigs fed CAS diets.

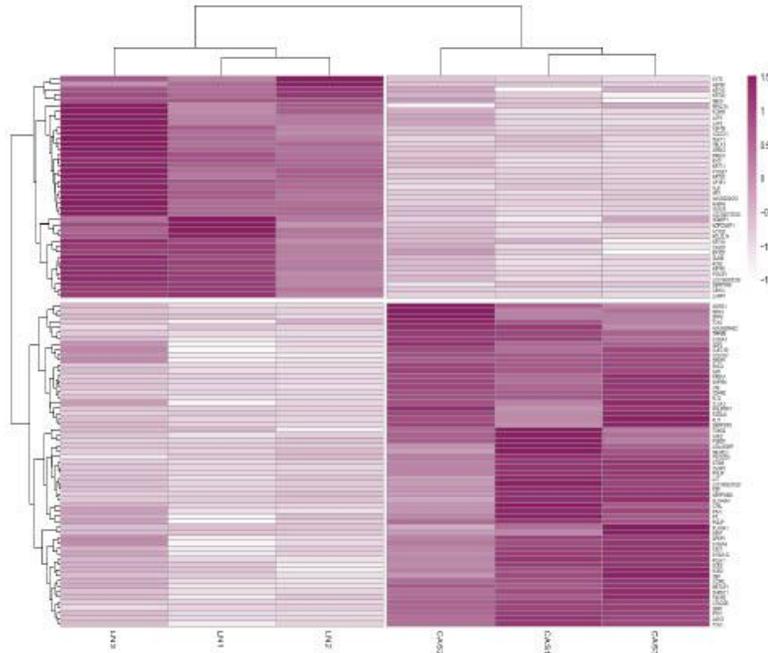


Figure 3. Heatmap of differentially abundant proteins (DAPs). Heatmap representing the hierarchical clustering of DAPs. Rows correspond to proteins and columns to samples. Colors represent the abundance values of proteins between NFD and CAS treatments.

The analysis revealed 60 proteins with high abundance in the CAS treatment (Table 3) and 41 in the NFD treatment (Table 4).

Table 3. Proteins with high abundance in the digesta of pigs fed CAS diets.

Accession	GEN	Protein Name	log ₂ FC
FZZ5U0		Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	4.96
A0A287A604	LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	4.68
F1SC72	NEURL2	Neutralized E3 ubiquitin protein ligase 2	3.51
A0A287B4A9	CFM1	G elongation factor mitochondrial 1	3.27
A0A287A6D8	PLXNA1	Plexin A1	3.26
A0A2C9F351	SLC44A4	Choline transporter-like protein	2.92
A0A286ZRF3	SERPINB6	Serpin family B member 6	2.80
I3LUP6	NPM1	Nucleophosmin	2.42
F1S1B9	DHRS11	Dehydrogenase/reductase 11	2.40
A0A287BGV4	ATAD2B	ATPase family AAA domain containing 2B	2.36
I3LHI7	LOC100621820	Peptidase S1 domain-containing protein	2.34
A0A5G2Q5S9	LCT	LPH hydrolase	2.18
F1RGB0	SSH1	Protein-serine/threonine phosphatase	2.11
A0A5G2R2I6	SNCA	Alpha-synuclein	1.96
A0A287B310	STOM	Stomatin	1.96
A0A5S6H025	VIM	Vimentin	1.95
A0A287AUI5	ANK2	Ankyrin-2	1.70
A0A286ZZ91	OVGP1	Oviduct-specific glycoprotein	1.69
A0A5G2Q9X4	ASAH2	Neutral ceramidase	1.64
I3LCF8	CTRL	Chymotrypsin like	1.63
A0A286ZUV2	CDHR2	Cadherin-related family member 2	1.50
A0A286ZTL5	WDR31	WD repeat domain 31	1.48
F1SFU5	S100A7	EF-hand domain-containing protein	1.47
F1SM15	TRPM8	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8	1.40
F1SSQ6	FLT4	Vascular endothelial growth factor receptor 3	1.34
A0A286ZWA9	SHPRH	SNF2 histone linker PHD RING helicase	1.33
P00591	PNLIP	Pancreatic triacylglycerol lipase	1.33
P00690	AMY2	Pancreatic alpha-amylase	1.31
A0A5G2RH22		L1 transposable element	1.22
A0A287B9B3	SERPINF2	Alpha-2-antiplasmin isoform X2	1.22
F6Q1W0	PNLIPRP1	Triacylglycerol lipase	1.22
P17630	TCN1	Transcobalamin-1	1.20
A0A5G2R7I6	DPP6	Dipeptidyl peptidase like 6	1.20
F1S1R8	PGBD1	PiggyBac transposable element derived 1	1.13
A0A287BIU6	LCORL	Ligand-dependent nuclear receptor co-repressor like	1.08
P80015	AZU1	Azurocidin	1.07
I3LSA5	AMY	Alpha-amylase	1.04
A0A5G2RJR8	PNLIP	Triacylglycerol lipase	1.03
P80310	S100A12	Protein S100-A12	1.02
A0A287A1B4	FZP	Pregnancy zone protein-like	1.02
A0A287BQW1	METAP1	Methionine aminopeptidase	0.97
P19130	FTH1	Ferritin heavy chain	0.93
A0A287AP88	TSC22D3	TSC22 domain family protein 3	0.89
P19133	FTL	Ferritin light chain (Fragment)	0.87
F1SEL6	GDF2	Growth Differentiation Factor 2	0.83
A0A287BHZ2	TUBC2	Tubulin gamma chain	0.76
F1RSU5	FLT1	Receptor protein-tyrosine kinase	0.75
A0A287AL10	FTH1	Ferritin	0.74
P81245	OBP	Odorant-binding protein	0.74
I3LNV9	CLEC1B	C-type lectin domain family 1 member B	0.73
K7GME6	S100A9	S100 binding calcium-binding protein A9	0.66
A0A287AES3	KRBA1	KRA B-A domain containing 1	0.65
P28768	SOD2	Superoxide dismutase [Mn]_ mitochondrial	0.63
I3L719	DPEP1	Dipeptidase	0.62
A0A287A4Z2	SOD2	Superoxide dismutase	0.57
A0A287A0W9	TCN1	Transcobalamin-1	0.56
A0A287AIG5	CCDC57	Coiled-coil domain containing 57	0.53
F1S4C6	CLCA2	Chloride channel accessory 2	0.53
P22412	DPEP1	Dipeptidase 1	0.52
C07564	FOLH1	Glutamate carboxypeptidase 2	0.52

Table 4. Proteins with high abundance in the digesta of pigs fed NFD.

Accession	GEN	Protein Name	log ₂ FC
FIRN44	LAMP1	associated lysosomal-associated membrane protein 1	-0.59
A0A286ZYN0	KRT15	Keratin 15	-0.61
A0A5G2RBD3	KRT18	Keratin 18	-0.64
A0A5G2QV66	NEK9	NIMA-related kinase 9	-0.64
FIRZRI	GGNBP1	Ubiquitin_3 domain-containing protein	-0.67
	A0A5G2QX93	DUF1725 domain-containing protein	-0.70
A0A287A4P2	LOC106507258	IF rod domain-containing protein	-0.72
A0A287BQR3	FCN2	Ficolin-2	-0.77
A0A287AZA7	RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	-0.80
A0A5K1UE53	SERPING1	Serpin family G member 1	-0.84
F1S793	CCDC15	Coiled-coil domain containing 15	-0.84
I3L6U3		Uncharacterized protein	-0.86
P08835	ALB	Albumin	-0.91
P10289	FABP6	Gastrotropin	-0.92
F1RXG2	KRT28	Keratin 28	-0.95
F1RMN7	HPX	Hemopexin	-0.98
I3L9U8	EP300	Histone acetyltransferase	-0.99
A0A5G2RAC7	CAND1	Cullin associated and neddylation dissociated 1	-1.01
A0A5K1V9N9	SYT5	Synaptotagmin 5	-1.02
F1SHN7	LRRK2	Non-specific serine/threonine protein kinase	-1.12
A0A287BD64	CELA3	Peptidase S1 domain-containing protein	-1.13
F1SQ67	BCL2L14	BCL2 like 14	-1.23
A0A286ZWT0	AP1B1	AP complex subunit beta	-1.23
F1RGN9	TEKT1	Tektin	-1.29
A0A5G2RMY5	ASH1L	ASH1-like histone lysine methyltransferase	-1.40
P35479		Leukocyte cysteine proteinase inhibitor 1	-1.40
A0A287ACY3	KCNHI	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 1	-1.49
A0A287AHM5	LOC100737030	IF rod domain-containing protein	-1.49
A0A2C9F3C0	GUSB	Beta-glucuronidase	-1.49
A0A286ZUE0	PREX1	Phosphatidylinositol-3_4_5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 1	-1.60
A0A5G2QPZ4	KRT20	Keratin_type I cytoskeletal 20	-1.60
P12067		Lysozyme C-1	-1.85
A0A5G2QA63	LAP3	Cytosol aminopeptidase	-1.93
P28839	LAP3	Cytosol aminopeptidase	-1.93
A0A2C9F366	HSPB1	Heat shock protein beta-1	-1.96
B6DX84	ASF1B	ASF1B	-2.06
A0A286ZM40	EVI5	Ecotropic viral integration site 5	-2.09
A0A287A2G9	KRT71	Keratin 71	-2.26
A0A286ZWI1	ACTG2	Actin gamma 2_smooth muscle	-2.36
A0A287B664	NOPCHAP1	NOP protein chaperone 1	-2.40
A0A287ARK0	KRT40	Keratin 40	-3.41

Separate GO and KEGG pathway enrichment analyses were performed for DAPs, which were highly abundant in the digesta of pigs fed CAS or NFD. Functional enrichment analysis of DAPs in the digesta of CAS-fed pigs revealed 17 GO terms significantly enriched for MFs and a CC term, cellular space (Figure 4A), and the KEGG pathway enrichment analysis revealed six significantly enriched pathways (Figure 4B). In contrast, DAPs in the NFD treatment revealed nine significantly enriched GO terms (Figure 4A) and four KEGG pathways (Figure 4B). The list of proteins within each GO term and KEGG pathway is available in the Supplementary Material Table S3.

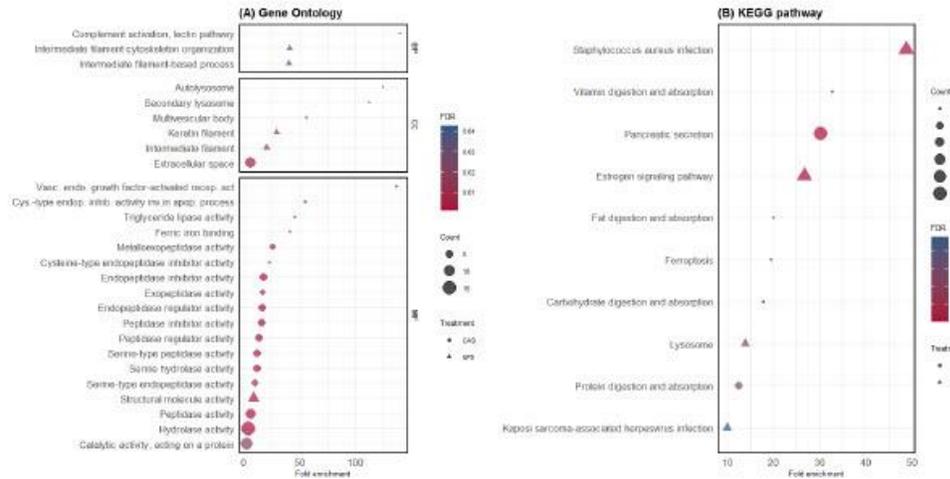


Figure 4. GO and KEGG pathway enrichment analysis of differentially abundant proteins. **(A)** GO enrichment analysis. The y-axis shows significantly enriched GO terms; BP: biological process, MF: molecular function, CC: cellular component (for each treatment (CAS and NFD)). The x-axis represents the fold enrichment, and the size of the dots represents the number of genes within each term. The colors of the dots represent the FDR enrichment. **(B)** KEGG pathway enrichment analysis. The x-axis displays the fold enrichment and the pathways enriched in CAS and NFD.

4. Discussion

The quantification of basal endogenous losses and the factors that affect them is essential to improve nitrogen use efficiency [19]. A proteomic approach was utilized to identify and quantify the endogenous protein composition in the ileal digesta of pigs fed NFD and CAS. The identified proteins give rise to the amino acids determined by conventional methods in ileal digestibility studies. Therefore, the findings of this study represent an approach to identify the origin of endogenous losses modified by diet composition, complementing the available information about endogenous protein losses [31]. A large number of endogenous proteins were identified in the ileal digesta. Functional enrichment analysis is a method for assigning functional annotations to proteins and grouping them into GO terms and KEGG pathways, reducing the complexity of individual protein analysis. This analysis allowed for the identification of biological and metabolic changes in the intestine modified by dietary composition, providing deeper insights into the impacts of the diets on basal endogenous loss secretions.

The identified endogenous proteins were associated with metabolic and physiological functions of the intestine, including nutrient transport, digestion, absorption, and immune responses, similar to other proteomic studies in pigs [27,32–35]. The intestinal epithelium is exposed to various external stimuli, leading to the expression of proteins that interact with feed and microorganisms in the intestinal lumen [36]. In this study, we identified proteins associated with the response to external stimuli, including chemical, physical, and other organismal stimuli. In addition, processes related to the immune response, the regulation of localization, cellular transport, and proteolysis were also highlighted.

To maintain physiological functions and intestinal homeostasis, the intestine contains secretory cells responsible for the continuous release of significant quantities of proteins into the intestinal lumen [37]. The secretory cells in the intestinal epithelium include mucus-producing goblet cells, antimicrobial peptide-secreting Paneth cells, hormone-secreting enteroendocrine cells, and rare infection-mediating tuft cells. These epithelial cells provide the first line of chemical and physical defense against external factors to ensure a stable

internal environment, supporting efficient digestion and absorption of nutrients [38]. These findings align with the results of the present study, which identified enriched terms associated with extracellular proteins and proteins secreted by vesicles. Notably, Annexin A4 (ANXA4), which promotes membrane fusion and is essential for exocytosis [39], was abundant in the digesta. Moreover, GO enriched terms were associated with catalytic, regulatory, or inhibitory enzymatic activity. At the molecular level, catalytic functions are indispensable for the regulation of inflammatory processes, extracellular tissue degradation, and intracellular particle breakdown in the intestine. Therefore, under physiological and pathological conditions, the gastrointestinal tract secretes a substantial quantity of proteases, including those originating from the pancreas and intestinal epithelium [40]. This study revealed a high abundance of proteases, such as Meprin A beta subunit (MEP1B), in the digesta. Meprins are metalloproteinases with a highly glycosylated domain that are abundantly expressed in the apical region of the ileal epithelial cells [41,42]. The Meprin A beta subunit regulates shedding of mucus secreted by goblet cells through proteolytic cleavage of MUC2, which leads to its release [42,43]. Although an increase in mucus secretion has been observed in animals fed an NFD [44], no differences were detected in the proteins associated with mucus secretion that were identified in this study (MUC2, MUC13, MEP1B, KLK1, ADAM10, CLCA1, and FCGBP) [43].

Furthermore, the intestinal secretion of endogenous protease inhibitors helps maintain intestinal homeostasis and protects biologically important proteins, such as immune-active proteins [40]. Alpha-2 macroglobulin (A2M), identified in the digesta, inhibits endopeptidases of all catalytic types, preventing the degradation of endogenous biologically active proteins without interfering with the active site of the protease [45]. In the intestine, immunoglobulin production is essential for protecting the epithelial barrier. Through proteomic analyses, immunoglobulins and their fragments have been identified as some of the most abundant endogenous proteins in the digesta [32–34], consistent with our findings, where different immunoglobulin fragments were identified. Additionally, Ig lambda chain C and IgA constant regions were the two most abundant proteins in the digesta. Despite the observed reduction in immunoglobulin production under nutrient deprivation [46], no differences were observed between the treatments in our study, likely due to the increased starch availability in NFD, which could have modulated the microbiota and increased immunoglobulin production [46].

Enzymatic secretion is one of the main components of endogenous loss in the ileum [5,19]. In this study, the proteins identified in the digesta enriched pathways associated with the digestion and absorption of proteins, carbohydrates, lipids, vitamins, and minerals, similar to previous proteomics findings in the digesta of growing pigs [35]. Of these, 19 corresponded to pancreatic secretions. Research in pigs has shown that pancreatic secretions typically account for approximately 5% of endogenous nitrogen secreted in the intestine [5]. Diet composition alters enzyme secretion, and in starch-rich diets, an increase in salivary and pancreatic amylases as well as sucrase-isomaltase and maltase-glucoamylase in the intestine has been observed [47]. In this study, maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase were the most abundant proteins in the digesta, although no differences were observed between the treatments. The absence of differences could be due to a compensatory increase in maltase-glucoamylase in pigs fed the NFD, as in situations of decreased amylase activity, its secretion increases to hydrolyze starch [33]. This is consistent with the reduction in pancreatic amylase (AMY and AMY2) levels observed in NFD-fed pigs. Furthermore, nutrient deprivation has been associated with a decrease in the synthesis and secretion of pancreatic enzymes [46–48], similar to the findings of this study, where NFD-fed pigs showed decreased secretion of pancreatic proteases and lipases, along with other intestinal peptidases and proteins involved in the digestion and absorption of vitamins and minerals.

High dietary carbohydrate levels have been associated with an increased abundance of pathogenic bacteria [49], potentially promoting the enrichment of the *S. aureus* infection pathway in the digesta and increasing this pathway in pigs fed NFD. Within this pathway, the protein Ficolin-2 (FCN2), which is overexpressed in the digesta of NFD-fed

pigs, participates in the complement activation lectin pathway by binding to lipoteichoic acid present in the cell walls of Gram-positive bacteria, including *S. aureus* [50,51]. The complement activation lectin pathway is crucial for innate antimicrobial host defense [52]. In addition to pathogens, lectin receptors recognize endosome derivatives and damage-associated molecular patterns in extracellular tissues [49,51]. Therefore, along with the enrichment of the autolysosome and lysosome pathways, these results suggest an increase in cellular autophagy in pigs fed NFD. Nutrient deficiency, including amino acid deficiency, decreases mTOR activity. mTOR phosphorylates the autophagy-initiating complex and inhibits autophagosome biogenesis.

Consequently, during prolonged periods of starvation, cellular autophagy increases, and autolysosome degradation products are recycled to maintain homeostasis and regulate cellular functions [53]. Furthermore, autophagy is promoted by the overgrowth of pathogenic bacteria [53]. These factors compromise the function of the intestinal barrier by stimulating a pro-inflammatory environment that increases cell renewal and preserves tissue integrity [50,51].

Intestinal epithelial cells exhibit a rapid turnover rate characterized by migration, differentiation, and cell renewal every 3–5 days, which is crucial for protecting integrity and maintaining intestinal functions [54–56]. Previous studies have identified epithelial cell desquamation as a major source of endogenous proteins in the ileum [5]. In this study, the proteins identified in the digesta enriched terms associated with the cytoskeleton, with keratin being the most abundant. Keratin and keratin filaments are resistant to cleavage by proteolytic enzymes because they are stabilized by numerous cross-linked disulfide bonds [57]. In the intestinal epithelium, undifferentiated crypt cells express K18, whereas villus cells express K20 [58,59]. The abundance of these keratins in the digesta of pigs fed the NFD suggests an increase in intestinal epithelial cell turnover [60], which is consistent with previous findings demonstrating increased epithelial desquamation in animals fed NFD.

The increased rate of intestinal renewal may explain the enrichment of the estrogen signaling pathway in the digesta. This pathway is crucial for regulating epithelial cell proliferation and differentiation in the intestine, where estrogen acts as a transcription regulator [61,62]. Additionally, this pathway regulates the electrolyte balance and contributes to intestinal HCO₃ secretion [63]. In NFD-fed pigs, this pathway was upregulated compared to CAS-fed pigs. Moreover, the high abundance of leucine-rich protein (LRRIQ3), which is implicated in intestinal repair [50], in the digesta of NFD-fed pigs suggests an increase in cell renewal. The presence of EP300, PREX1, and RPS27A proteins, which enrich the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection pathway and growth differentiation factor 2 (GDF2), which stimulates cell differentiation, proliferation, and migration in enterocytes, intestinal stem cells, and goblet cells under conditions of inflammation [64–66], supports the hypothesis of increased intestinal epithelial cell shedding in NFD-fed pigs.

In the gastrointestinal tract, the renin–angiotensin system regulates the intestinal environment by modulating various physiological processes such as gastrointestinal motility, fluid secretion, and absorption, as well as the uptake of peptides, amino acids, glucose, and sodium [67,68]. Angiotensin-converting enzyme (ACE2), a cell membrane-bound carboxypeptidase predominantly expressed in the ileum, is essential for the function of the sodium-dependent amino acid transporter B(0)AT1 [69]. Previous proteomic studies conducted on the intestines of pigs have observed the enrichment of this pathway in the digesta [35], a finding consistent with the results of the present study. Additionally, it has been noted that endogenous secretions exhibit increased ACE inhibitory bioactivity [70], suggesting a potential mechanism of intestinal homeostasis aimed at regulating intestinal secretions.

5. Conclusions

In conclusion, the proteomic analyses performed in this study enabled the identification of endogenous proteins in the ileal digesta. The findings suggest that pigs fed a casein diet could be a better alternative for basal endogenous loss estimation due to promoting

normal intestinal secretion and maintaining intestinal health. Basal endogenous losses can impact the nutrient requirements of protein and amino acids due to the metabolic cost associated with the synthesis and turnover of endogenous proteins in the intestine. Therefore, identifying endogenous proteins could significantly enhance the development of nutritional strategies aimed at maximizing nutrient utilization in pigs. While label-free proteomics sacrifices some precision, this approach could be considered a complementary and cost-effective method for characterizing and quantifying endogenous proteins in the ileal digesta under different feeding conditions. Comprehension of the factors that influence endogenous ileal losses is essential for improving nutrient utilization efficiency.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani14132000/s1>: Table S1. Abundance of endogenous proteins identified in the digesta of growing pigs fed NFD and CAS diets; Table S2. Gene Ontology and KEGG pathway enrichment analysis of ileal endogenous proteins. Biological process (BP), cellular compartment (CC), molecular function (MF), and KEGG pathways; Table S3. Gene Ontology (GO) and KEGG pathway enrichment analysis of differentially abundant proteins (DAPs). Biological process (BP), molecular function (MF), and cellular component (CC).

Author Contributions: Conceptualization, G.M.-L., T.C.R.d.S. and I.E.Á.-A.; methodology, G.M.-L. and I.E.Á.-A.; software, I.E.Á.-A. and G.M.-L.; formal analysis, I.E.Á.-A. and E.R.H.; investigation, G.M.-L. and I.E.Á.-A.; resources, G.M.-L. and T.C.R.d.S.; data curation, I.E.Á.-A.; writing—original draft preparation, I.E.Á.-A. and G.M.-L.; writing—review and editing, I.E.Á.-A., G.M.-L., T.C.R.d.S., E.R.H. and S.G.R.; funding acquisition, G.M.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported partially by the National Institute of Agricultural and Livestock Forestry Research (INIFAP-México) for financial support of the Research Project SIGI (Number 13202534765).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the UNAM (Protocol SICUA.E.DC-2021/2-2; approval date: 25 June 2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (<https://www.ebi.ac.uk/pride/> accessed on 24 May 2024) partner repository with the dataset identifier PXD052560.

Acknowledgments: Mass spectrometry-based proteomics was performed at the Genomics, Proteomics and Metabolomics Core Facility (UGPM), LaNSE, CINVESTAV-IPN; hence, we want to thank ChemE, Nataly Ramos Buendía, and Emmanuel Ríos Castro for their help during sample preparation and LC-MS analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Lee, S.A.; Jo, H.; Kong, C.; Kim, B.G. Use of Digestible Rather than Total Amino Acid in Diet Formulation Increases Nitrogen Retention and Reduces Nitrogen Excretion from Pigs. *Livest. Sci.* **2017**, *197*, 8–11. [[CrossRef](#)]
2. Pomar, C.; Andretta, I.; Remus, A. Feeding Strategies to Reduce Nutrient Losses and Improve the Sustainability of Growing Pigs. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 742220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Stein, H.H.; Sève, B.; Fuller, M.F.; Moughan, P.J.; de Lange, C.F.M. Invited Review: Amino Acid Bioavailability and Digestibility in Pig Feed Ingredients: Terminology and Application. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 172–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Miner-Williams, W.; Deglaire, A.; Benamouzig, R.; Fuller, M.F.; Tomé, D.; Moughan, P.J. Endogenous Proteins in the Ileal Digesta of Adult Humans Given Casein-, Enzyme-Hydrolyzed Casein- or Crystalline Amino-Acid-Based Diets in an Acute Feeding Study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2014**, *68*, 363–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Nyachoti, C.; de Lange, C.; McBride, B.; Schulze, H. Significance of Endogenous Gut Nitrogen Losses in the Nutrition of Growing Pigs: A Review. *Can. J. Anim. Sci.* **1997**, *77*, 149–163. [[CrossRef](#)]
6. Adeola, O.; Xue, P.C.; Cowieson, A.J.; Ajuwon, K.M. Basal Endogenous Losses of Amino Acids in Protein Nutrition Research for Swine and Poultry. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2016**, *221*, 274–283. [[CrossRef](#)]
7. Nasset, E.S.; Ju, J.S. Mixture of Endogenous and Exogenous Protein in the Alimentary Tract. *J. Nutr.* **1961**, *74*, 461–465. [[CrossRef](#)]

8. Souffrant, W.; Rérat, A.; Laplace, J.; Darcy-Vrillon, B.; Köhler, R.; Corring, T.; Gebhardt, G.; Bernard, F.; Jähnichen, M.; Schneider, B.; et al. Exogenous and Endogenous Contributions to Nitrogen Fluxes in the Digestive Tract of Pigs Fed a Casein Diet. III. Recycling of Endogenous Nitrogen. *Reprod. Nutr. Dev.* **1993**, *33*, 373–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ravindran, V. Feed-Induced Specific Ileal Endogenous Amino Acid Losses: Measurement and Significance in the Protein Nutrition of Monogastric Animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2016**, *221*, 304–313. [[CrossRef](#)]
10. Kong, C.; Ragland, D.; Adeola, O. Ileal Endogenous Amino Acid Flow Response to Nitrogen-Free Diets with Differing Ratios of Corn Starch to Dextrose in Pigs. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2014**, *27*, 1124–1130. [[CrossRef](#)]
11. Adedokun, S.A.; Dong, K.; Harmon, D.L. Evaluating the Effects of Adaptation Length, Dietary Electrolyte Balance, and Energy Source on Ileal Endogenous Amino Acid Losses in Pigs Fed Nitrogen-Free Diets. *Can. J. Anim. Sci.* **2019**, *99*, 532–541. [[CrossRef](#)]
12. Park, C.S.; Adeola, O. Basal Ileal Endogenous Losses of Amino Acids in Pigs Determined by Feeding Nitrogen-Free Diet or Low-Casein Diet or by Regression Analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2020**, *267*, 114550. [[CrossRef](#)]
13. Deglaire, A.; Moughan, P.J.; Tomé, D. A Casein Hydrolysate Does Not Enhance Ileal Endogenous Protein Flows Compared with the Parent Intact Casein When Fed to Growing Pigs. *Curr. Dev. Nutr.* **2019**, *3*, nzy083. [[CrossRef](#)]
14. Brestenský, M.; Nitrayová, S.; Patráš, P. Ileal Endogenous Losses in Pigs Feeding a Protein-Free Diet or Diets with Different Contents of Casein or Crystalline Amino Acids. *Arch. Anim. Nutr.* **2017**, *71*, 210–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mariscal-Landín, G.; Reis de Souza, T.C. Endogenous Ileal Losses of Nitrogen and Amino Acids in Pigs and Piglets Fed Graded Levels of Casein. *Arch. Anim. Nutr.* **2006**, *60*, 454–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Jansman, A.J.M.; Smink, W.; Van Leeuwen, P.; Rademacher, M. Evaluation through Literature Data of the Amount and Amino Acid Composition of Basal Endogenous Crude Protein at the Terminal Ileum of Pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2002**, *98*, 49–60. [[CrossRef](#)]
17. Corring, T.; Souffrant, W.B.; Darcy-Vrillon, B.; Gebhardt, G.; Laplace, J.P.; Rerat, A. Exogenous and Endogenous Contribution to Nitrogen Fluxes in the Digestive Tract of Pigs Fed a Casein Diet. I. Contributions of Nitrogen from the Exocrine Pancreatic Secretion and the Bile. *Reprod. Nutr. Dev.* **1990**, *30*, 717–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Duvaux, C.; Guilloteau, P.; Toullec, R.; Sissons, J.; Duvaux, C.; Sissons, J.W. A New Method of Estimating the Proportions of Different Proteins in a Mixture Using Amino Acid Profiles: Application to Undigested Proteins in the Preruminant Calf. *Ann. Zootech.* **1990**, *39*, 9–18. [[CrossRef](#)]
19. Ravindran, V. Progress in Ileal Endogenous Amino Acid Flow Research in Poultry. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2021**, *12*, 5. [[CrossRef](#)]
20. Verberkmoes, N.C.; Russell, A.L.; Shah, M.; Godzik, A.; Rosenquist, M.; Halfvarson, J.; Lefsrud, M.G.; Apajalahti, J.; Tysk, C.; Hettich, R.L.; et al. Shotgun Metaproteomics of the Human Distal Gut Microbiota. *ISME J.* **2009**, *3*, 179–189. [[CrossRef](#)]
21. NOM-062-ZOO-1999; Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. Norma Oficial Mexicana: Mexico City, Mexico, 2001.
22. CIOMS. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. In *The Development of Science-Based Guide-Lines for Laboratory Animal Care*; NCBI Bookshelf: Geneva, Switzerland, 2012.
23. Reis de Souza, T.C.; Mar-Botello, B.; Mariscal-Landín, G. Canulación de Cerdos Postdestete Para Pruebas de Digestibilidad Ileal: Desarrollo de Una Metodología. *Técnica Pecu. México* **2000**, *38*, 143–150.
24. NRC. *Nutrient Requirements of Swine*; Eleventh Revised; National Academy Press: Washington, DC, USA, 2012.
25. INRA. *L'alimentation Des Animaux Monogastriques: Porc, Lapin, Volaille*; Institut National de la Recherche Agronomique: Paris, France, 1984.
26. Reis de Souza, T.C.; Ávila Árras, I.E.; Ramírez Rodríguez, E.; Mariscal-Landín, G. Effects of Kafirins and Tannins Concentrations in Sorghum on the Ileal Digestibility of Amino Acids and Starch, and on the Glucose and Plasma Urea Nitrogen Levels in Growing Pigs. *Livest. Sci.* **2019**, *227*, 29–36. [[CrossRef](#)]
27. Qin, C.; Qiu, K.; Sun, W.; Jiao, N.; Zhang, X.; Che, L.; Zhao, H.; Shen, H.; Yin, J. A Proteomic Adaptation of Small Intestinal Mucosa in Response to Dietary Protein Limitation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ríos-Castro, E.; Souza, G.H.M.F.; Delgado-Alvarez, D.M.; Ramírez-Reyes, L.; Torres-Huerta, A.L.; Velasco-Suárez, A.; Cruz-Cruz, C.; Hernández-Hernández, J.M.; Tapia-Ramírez, J. Quantitative Proteomic Analysis of MARC-145 Cells Infected with a Mexican Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain Using a Label-Free Based DIA Approach. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, *31*, 1302–1312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Silva, J.C.; Gorenstein, M.V.; Li, G.-Z.; Vissers, J.P.C.; Geromanos, S.J. Absolute Quantification of Proteins by LCMSE. *Mol. Cell. Proteom.* **2006**, *5*, 144–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ge, S.X.; Jung, D.; Yao, R. ShinyGO: A Graphical Gene-Set Enrichment Tool for Animals and Plants. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 2628–2629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Cowieson, A.J.; Klausen, M.; Pontoppidan, K.; Faruk, M.U.; Roos, F.F.; Giessing, A.M.B. Identification of Peptides in the Terminal Ileum of Broiler Chickens Fed Diets Based on Maize and Soybean Meal Using Proteomics. In *Proceedings of the Animal Production Science*; CSIRO: Pullenvale, QLD, Australia, 2017; Volume 57, pp. 1738–1750.
32. Le Gall, M.; Quillien, L.; Guéguen, J.; Rogniaux, H.; Sève, B. Identification of Dietary and Endogenous Ileal Protein Losses in Pigs by Immunoblotting and Mass Spectrometry. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1215–1222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Recoules, E.; Sabboh-Jourdan, H.; Narcy, A.; Lessire, M.; Harichaux, G.; Labas, V.; Duclos, M.J.; Réhault-Godbert, S. Exploring the in Vivo Digestion of Plant Proteins in Broiler Chickens. *Poult. Sci.* **2017**, *96*, 1735–1747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Li, J.; Tan, B.; Tang, Y.; Liao, P.; Yao, K.; Ji, P.; Yin, Y. Extraction and Identification of the Chyme Proteins in the Digestive Tract of Growing Pigs. *Sci. China Life Sci.* **2018**, *61*, 1396–1406. [\[CrossRef\]](#)
35. Tröschler-Mußotter, J.; Tilocca, B.; Stefanski, V.; Seifert, J. Analysis of the Bacterial and Host Proteins along and across the Porcine Gastrointestinal Tract. *Proteomes* **2019**, *7*, 4. [\[CrossRef\]](#)
36. Haber, A.L.; Biton, M.; Rogel, N.; Herbst, R.H.; Shekhar, K.; Smillie, C.; Burgin, G.; Delorey, T.M.; Howitt, M.R.; Katz, Y.; et al. A Single-Cell Survey of the Small Intestinal Epithelium. *Nature* **2017**, *551*, 333–339. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Gelberg, H.B. Comparative Anatomy, Physiology, and Mechanisms of Disease Production of the Esophagus, Stomach, and Small Intestine. *Toxicol. Pathol.* **2014**, *42*, 54–66. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Gieryńska, M.; Szulc-Dąbrowska, L.; Struzik, J.; Mielcarska, M.B.; Gręgorczyk-Zboroch, K.P. Integrity of the Intestinal Barrier: The Involvement of Epithelial Cells and Microbiota—A Mutual Relationship. *Animals* **2022**, *12*, 145. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Peng, Y.; Zhang, Z.; Zhang, A.; Liu, C.; Sun, Y.; Peng, Z.; Liu, Y. Membrane-Cytoplasm Translocation of Annexin A4 Is Involved in the Metastasis of Colorectal Carcinoma. *Aging* **2021**, *13*, 10312–10325. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Vergnolle, N. Protease Inhibition as New Therapeutic Strategy for GI Diseases. *Gut* **2016**, *65*, 1215–1224. [\[CrossRef\]](#)
41. Bond, J.S.; Matters, G.L.; Banerjee, S.; Dusheck, R.E. Meprin Metalloprotease Expression and Regulation in Kidney, Intestine, Urinary Tract Infections and Cancer. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 3317–3322. [\[CrossRef\]](#)
42. Werry, L.; Colmorgen, C.; Becker-Pauly, C. Regulation of Meprin Metalloproteases in Mucosal Homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2022**, *1869*, 119158. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Paone, P.; Cani, P.D. Mucus Barrier, Mucins and Gut Microbiota: The Expected Slimy Partners? *Gut* **2020**, *69*, 2232–2243. [\[CrossRef\]](#)
44. Zhou, H.; Wu, W.; Mahmood, T.; Chen, Y.; Xu, Y.; Wang, Y.; Yuan, J. Comparison of Endogenous Amino Acid Losses in Broilers When Offered Nitrogen-Free Diets with Differing Ratios of Dextrose to Corn Starch. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 5689. [\[CrossRef\]](#)
45. Vandoooren, J.; Itoh, Y. Alpha-2-Macroglobulin in Inflammation, Immunity and Infections. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 803244. [\[CrossRef\]](#)
46. Parsons, B.W.; Drysdale, R.L.; Cvengros, J.E.; Utterback, P.L.; Rochell, S.J.; Parsons, C.M.; Emmert, J.L. Quantification of Secretory IgA and Mucin Excretion and Their Contributions to Total Endogenous Amino Acid Losses in Roosters That Were Fasted or Precision-Fed a Nitrogen-Free Diet or Various Highly Digestible Protein Sources. *Poult. Sci.* **2023**, *102*, 102554. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Kurz, A.; Seifert, J. Factors Influencing Proteolysis and Protein Utilization in the Intestine of Pigs: A Review. *Animals* **2021**, *11*, 3551. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. He, L.; Wu, L.; Xu, Z.; Li, T.; Yao, K.; Cui, Z.; Yin, Y.; Wu, G. Low-Protein Diets Affect Ileal Amino Acid Digestibility and Gene Expression of Digestive Enzymes in Growing and Finishing Pigs. *Amino Acids* **2016**, *48*, 21–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Vitko, N.P.; Spahich, N.A.; Richardson, A.R. Glycolytic Dependency of High-Level Nitric Oxide Resistance and Virulence in *Staphylococcus Aureus*. *mBio* **2015**, *6*, e00045-15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Prossomariti, A.; Sokol, H.; Ricciardiello, L. Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat Containing Proteins and Intestinal Microbiota: Pivotal Players in Colitis and Colitis-Associated Cancer Development. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1039. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Drouin, M.; Saez, J.; Chiffolleau, E. C-Type Lectin-Like Receptors: Head or Tail in Cell Death Immunity. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Lynch, N.J.; Roscher, S.; Hartung, T.; Morath, S.; Matsushita, M.; Maennel, D.N.; Kuraya, M.; Fujita, T.; Schwaebler, W.J. L-Ficolin Specifically Binds to Lipoteichoic Acid, a Cell Wall Constituent of Gram-Positive Bacteria, and Activates the Lectin Pathway of Complement. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 1198–1202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Nakatogawa, H. Mechanisms Governing Autophagosome Biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 439–458. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Gebert, N.; Cheng, C.-W.; Kirkpatrick, J.M.; Di Fraia, D.; Yun, J.; Schädel, P.; Pace, S.; Garside, G.B.; Werz, O.; Rudolph, K.L.; et al. Region-Specific Proteome Changes of the Intestinal Epithelium during Aging and Dietary Restriction. *Cel Rep.* **2020**, *31*, 107565. [\[CrossRef\]](#)
55. Qi, D.; Shi, W.; Black, A.R.; Kuss, M.A.; Pang, X.; He, Y.; Liu, B.; Duan, B. Repair and Regeneration of Small Intestine: A Review of Current Engineering Approaches. *Biomaterials* **2020**, *240*, 119832. [\[CrossRef\]](#)
56. Modina, S.C.; Aidos, L.; Rossi, R.; Pocar, P.; Corino, C.; Di Giancamillo, A. Stages of Gut Development as a Useful Tool to Prevent Gut Alterations in Piglets. *Animals* **2021**, *11*, 1412. [\[CrossRef\]](#)
57. Bragulla, H.H.; Homberger, D.G. Structure and Functions of Keratin Proteins in Simple, Stratified, Keratinized and Cornified Epithelia. *J. Anat.* **2009**, *214*, 516–559. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Zhou, Q.; Toivola, D.M.; Feng, N.; Greenberg, H.B.; Franke, W.W.; Omary, M.B. Keratin 20 Helps Maintain Intermediate Filament Organization in Intestinal Epithelia. *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14*, 2959–2971. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Mun, J.; Hur, W.; Ku, N.-O. Roles of Keratins in Intestine. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8051. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Iwatsuki, H.; Suda, M. Maturation of Three Kinds of Keratin Networks in the Absorptive Cells of Rabbit Duodenum. *Acta Histochem. Cytochem.* **2005**, *38*, 237–245. [\[CrossRef\]](#)
61. Chen, C.; Gong, X.; Yang, X.; Shang, X.; Du, Q.; Liao, Q.; Xie, R.; Chen, Y.; Xu, J. The Roles of Estrogen and Estrogen Receptors in Gastrointestinal Disease. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 5673–5680. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

62. Soler, L.; Stella, A.; Seva, J.; Pallarés, F.J.; Lahjouji, T.; Bulet-Schiltz, O.; Oswald, I.P. Proteome Changes Induced by a Short, Non-Cytotoxic Exposure to the Mycoestrogen Zearalenone in the Pig Intestine. *J. Proteom.* **2020**, *224*, 103842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Yang, X.; Guo, Y.; He, J.; Zhang, F.; Sun, X.; Yang, S.; Dong, H. Estrogen and Estrogen Receptors in the Modulation of Gastrointestinal Epithelial Secretion. *Oncotarget* **2017**, *8*, 97683–97692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ye, R.D. The Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor P-Rex1 as a Potential Drug Target for Cancer Metastasis and Inflammatory Diseases. *Pharmacol. Res.* **2020**, *153*, 104676. [[CrossRef](#)]
65. Shao, Q.; Chen, Z.-M. Feedback Regulation between Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate Dependent Rac Exchange Factor 1 and Transforming Growth Factor B1 and Prognostic Value in Gastric Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2020**, *26*, 21–34. [[CrossRef](#)]
66. Yin, J.; Zhao, Z.; Huang, J.; Xiao, Y.; Rehmulla, M.; Zhang, B.; Zhang, Z.; Xiang, M.; Tong, Q.; Zhang, Y. Single-Cell Transcriptomics Reveals Intestinal Cell Heterogeneity and Identifies Ep300 as a Potential Therapeutic Target in Mice with Acute Liver Failure. *Cell Discov.* **2023**, *9*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Jaworska, K.; Koper, M.; Ufnal, M. Gut Microbiota and Renin-Angiotensin System: A Complex Interplay at Local and Systemic Levels. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2021**, *321*, G355–G366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Zizzo, M.G.; Serio, R. The Renin–Angiotensin System in Gastrointestinal Functions. In *Angiotensin*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2023; pp. 681–697.
69. Ferreira-Duarte, M.; Oliveira, L.C.G.; Quintas, C.; Esteves-Monteiro, M.; Duarte-Araújo, M.; Sousa, T.; Casarini, D.E.; Morato, M. Actividad Catalítica ACE y ACE2 en el Contenido Fecal a Lo Largo Del Intestino. *Neurogastroenterol. Motil.* **2023**, *35*, e14598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Dave, L.A.; Montoya, C.A.; Rutherford, S.M.; Moughan, P.J. Gastrointestinal Endogenous Proteins as a Source of Bioactive Peptides—An In Silico Study. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

9. DISCUSIÓN GENERAL

La estimación de las pérdidas endógenas basales de aminoácidos mediante el uso de dietas libres de nitrógeno ha sido criticada por ser considerada no fisiológica. Por lo tanto, uno de los objetivos del estudio fue evaluar el estado metabólico de los cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno y con caseína a través diferentes metabolitos plasmáticos. En este estudio, observamos que las concentraciones plasmáticas de albumina disminuyeron en los cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno, lo que concuerda con otros estudios en cerdos restringidos en proteína o aminoácidos (Wykes et al., 1996; Hellwing et al., 2007; Regmi et al., 2018). Esta disminución podría deberse a que la síntesis de albumina es estimulada agudamente por el consumo de proteína o aminoácidos (Caso et al., 2007). Además, en estos cerdos también se observó un incremento de creatinina y de las enzimas AST y ALT, lo que puede ser resultado del incremento en el catabolismo muscular (Wang et al., 2017; Wang et al., 2021). En condiciones de restricción de proteína en la dieta, el incremento en las concentraciones plasmáticas de urea se ha asociado a un aumento en la degradación de proteína (Watford, 2003), aunque en este estudio no se observaron diferencias. La falta de respuesta podría deberse a un incremento en la eficiencia en la utilización nitrógeno no proteico en el tracto gastrointestinal durante periodos de restricción de proteína, donde se incrementa la tasa de reciclaje de nitrógeno para minimizar las pérdidas de nitrógeno endógeno (Thacker et al., 1982; Fuller & Reeds, 1998; Krone et al., 2019). Esto es consistente con lo observado en el flujo endógeno, donde las pérdidas endógenas basales de nitrógeno fueron similares entre los tratamientos. Sin embargo, se ha observado un incremento en las pérdidas endógenas basales tanto de proteína como aminoácidos cuando se alimenta con dietas con caseína (Adeola et al., 2016; Jansman et al., 2002). En este estudio, los cerdos alimentados con caseína mostraron un incremento en las pérdidas endógenas basales de aminoácidos en comparación con los cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno. Sin embargo, contrario a lo observado en este estudio, algunos autores han reportado un incremento en las pérdidas endógenas basales de prolina, asociada a la degradación de proteína muscular (de Lange et al., 1989). Los aminoácidos más abundantes en la digesta ileal son ácido glutámico, ácido aspártico, treonina, prolina, serina y glicina (Ravindran, 2021), lo que concuerda con los resultados de este estudio. En los cerdos alimentados con dietas con caseína el incremento de ácido

glutámico el flujo ileal se ha asociado a la digestión y absorción incompleta de caseína, ya que es el aminoácido más abundante en esta proteína (Adeola et al., 2016). Sin embargo, el ácido aspártico, ácido glutámico, serina, prolina, glicina, alanina, treonina y los aminoácidos ramificados son muy abundantes en las enzimas digestivas y mucoproteínas (Chung y Baker, 1992; Ravindran et al., 2008; Macelline et al., 2021;). Por lo que el incremento de estos aminoácidos en el flujo ileal podría deberse a un incremento en las secreciones digestivas debido a la presencia de proteína en las dietas con caseína (He et al., 2016; Kurz y Seifert, 2021; Macelline et al., 2021; Modina et al., 2021). Sin embargo, las proteínas endógenas que originan las variaciones en el perfil de aminoácidos en el flujo ileal no son fáciles de identificar, y se han subestimado debido a que los aminoácidos más abundantes en el flujo ileal son aminoácidos no esenciales. Algunos autores han resaltado la importancia del método debido a las variaciones en algunos aminoácidos esenciales como lisina, treonina y triptófano, que son limitantes en dietas maíz-soya (Park y Adeola, 2020). En este estudio, a través de análisis proteómicos, se identificaron y cuantificaron a las proteínas de la digesta. Las proteínas identificadas estuvieron asociadas a funciones metabólicas y fisiológicas específicas del tracto gastrointestinal, similar a lo reportado en otros estudios proteómicos (Le Gall et al., 2005; Qin et al., 2016; Recoules et al., 2017; Tröscher-Mußotter et al., 2019). Entre las proteínas más abundantes en la digesta se encontraron fracciones de inmunoglobulinas y enzimas digestivas, principalmente péptidos de maltasa-glucoamilasa, los cuales son abundantes en ácido aspártico y ácido glutámico. Sin embargo, no fue posible relacionar directamente los aminoácidos obtenidos a través de HPLC con los péptidos obtenidos por espectrometría de masas. A través de análisis bioinformáticos se identificaron las funciones moleculares, procesos biológicos y los componentes celulares a los que pertenecen las proteínas identificadas, así como las vías metabólicas modificadas por la composición de la dieta. En los cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno se observó un incremento en la inflamación intestinal, en la respuesta inmune, la autofagia y el recambio celular, y una reducción en las secreciones pancreáticas e intestinales en comparación con los cerdos alimentados con dietas con caseína. Estos resultados sugieren que es esencial considerar el efecto de la dieta sobre el estado metabólico para una estimación más precisa de las pérdidas endógenas basales de aminoácidos. En este sentido, la utilización de dietas con caseína es más adecuada, ya que favorece las secreciones normales del tracto gastrointestinal. Además, el enfoque proteómico utilizado en este estudio proporciona una valiosa herramienta complementaria

para identificar y cuantificar las proteínas endógenas presentes en la digesta, ofreciendo una comprensión más profunda de las pérdidas endógenas y su relación con la dieta.

10. CONCLUSIONES

Este estudio proporciona una visión sobre las implicaciones metabólicas de las dietas utilizadas en la determinación de las pérdidas endógenas basales ileales de aminoácidos en cerdos. La determinación de los metabolitos plasmáticos reveló cambios metabólicos en los cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno que podrían afectar la estimación de las pérdidas endógenas basales. No se observaron efectos significativos en el metabolismo energético o de lípidos. Sin embargo, en los cerdos alimentados con dietas libres de nitrógeno se observó una disminución en la síntesis de albumina plasmática y un incremento en los niveles de creatinina; lo que indica un balance negativo de proteínas que impacta en las secreciones endógenas en el tracto gastrointestinal, afectando la cantidad y por lo tanto el perfil de los aminoácidos en la digesta ileal. Además, las proteínas identificadas en la digesta ileal a través de análisis proteómicos demostraron que la alimentación con dietas con caseína pueden ser una mejor alternativa para la estimación de las pérdidas endógenas basales, ya que estas dietas estimulan las secreciones normales del intestino. Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar el estado metabólico de los animales para obtener una estimación precisa de las pérdidas endógenas basales de aminoácidos. Comprender los factores que influyen en estas pérdidas es esencial para mejorar la eficiencia en la utilización de nutrientes. Aunque los análisis proteómicos proporcionaron una gran cantidad de información, futuros estudios y análisis son necesarios para relacionar los aminoácidos de la dieta con los péptidos identificados y proporcionar más información sobre el efecto de la dieta en las secreciones endógenas.

11. REFERENCIAS

- Adedokun, S. A., Parsons, C. M., Lilburn, M. S., Adeola, O., & Applegate, T. J. (2007). Endogenous Amino Acid Flow in Broiler Chicks Is Affected by the Age of Birds and Method of Estimation. *Poultry Science*, *86*(12), 2590–2597. <https://doi.org/10.3382/PS.2007-00096>
- Adeola, O., Xue, P. C., Cowieson, A. J., & Ajuwon, K. M. (2016). Basal endogenous losses of amino acids in protein nutrition research for swine and poultry. *Animal Feed Science and Technology*, *221*, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.004>
- Aderibigbe, A., Cowieson, A., Ajuwon, K. M., & Adeola, O. (2021). Contribution of purified soybean trypsin inhibitor and exogenous protease to endogenous amino acid losses and mineral digestibility. *Poultry Science*, *100*(12), 101486. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101486>
- Ahn, J. Y., Kim, I. Y., Oh, S. J., Hwang, H. S., Yi, S. S., Kim, Y. N., Shin, J. H., Yoon, Y. S., & Seong, J. K. (2014). Proteomic analysis of domestic pig pancreas during development using two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Laboratory Animal Research*, *30*(2), 45–53. <https://doi.org/10.5625/lar.2014.30.2.45>
- Almeida, A. M., Bassols, A., Bendixen, E., Bhide, M., Ceciliani, F., Cristobal, S., Eckersall, P. D., Hollung, K., Lisacek, F., Mazzucchelli, G., McLaughlin, M., Miller, I., Nally, J. E., Plowman, J., Renaut, J., Rodrigues, P., Roncada, P., Staric, J., & Turk, R. (2014). Animal board invited review: Advances in proteomics for animal and food sciences. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, *9*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002602>
- Barpatsalou, V., Dubbelboer, I. R., Rodler, A., Jacobson, M., Karlsson, E., Pedersen, B. L., & Bergström, C. A. S. (2021). Physiological properties, composition and structural profiling of porcine gastrointestinal mucus. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *169*, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.10.008>

- Brestenský, M., Nitrayová, S., & Patráš, P. (2017). Ileal endogenous losses in pigs feeding a protein-free diet or diets with different contents of casein or crystalline amino acids. *Archives of Animal Nutrition*, 71(3), 210–218. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2017.1312832>
- Caso, G., Feiner, J., Mileva, I., Bryan, L. J., Kelly, P., Autio, K., Gelato, M. C., & McNurlan, M. A. (2007). Response of albumin synthesis to oral nutrients in young and elderly subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 446–451. <https://academic.oup.com/ajcn/article/85/2/446/4649781>
- Chen, Y., Michalak, M., & Agellon, L. B. (2018). Importance of Nutrients and Nutrient Metabolism on Human Health. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 91(2), 95–103.
- Chiang, J. Y. L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*, 50(10), 1955–1966. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900010-JLR200>
- Chung, T. K., & Baker, D. H. (1992). Apparent and true amino acid digestibility of a crystalline amino acid mixture and of casein: comparison of values obtained with ileal-cannulated pigs and cecectomized cockerels. *Journal of Animal Science*, 70(12), 3781–3790. <https://doi.org/10.2527/1992.70123781x>
- Corfield, A. P. (2001). Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 6(3), D1321–D1357. <https://doi.org/10.2741/A684>
- Corring, T., Calmes, R., Rérat, A., & Geugneau, A. M. (1984). Effect of a short-term protein-free diet on endogenous nitrogen secretion: exocrine pancreas secretion in the pig. *Reproduction, Nutrition, Développement*, 24(4), 495–506.
- Cowieson, A. J., Klausen, M., Pontoppidan, K., Faruk, M. U., Roos, F. F., & Giessing, A. M. B. (2017). Identification of peptides in the terminal ileum of broiler chickens fed diets based on maize and soybean meal using proteomics. *Animal Production Science*, 57(8), 1738–1750. <https://doi.org/10.1071/AN16213>
- Cowieson, A., Sorbara, J. O., Pappenberger, G., Abdollahi, M. R., Roos, F. F., & Ravindran, V. (2019). Additivity of apparent and standardized ileal amino acid digestibility of corn

- and soybean meal in broiler diets. *Poultry Science*, 98(9).
<https://doi.org/10.3382/ps/pez060>
- Dai, Z.-L., Wu, G., & Zhu, W.-Y. (2011). Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. *Frontiers in Bioscience*, 16(1), 1768.
<https://doi.org/10.2741/3820>
- de Lange, C. F. M., Sauer, W. C., & Souffrant, W. (1989). The effect of protein status of the pig on the recovery and amino acid composition of endogenous protein in digesta collected from the distal ileum. *Journal of Animal Science*, 67(3), 755–762.
<https://doi.org/10.2527/jas1989.673755x>
- Deglaire, A., & Moughan, P. J. (2012). Animal models for determining amino acid digestibility in humans - A review. *The British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 2), S273–S281.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512002346>
- Deglaire, A., Moughan, P. J., & Tomé, D. (2019). A casein hydrolysate does not enhance ileal endogenous protein flows compared with the parent intact casein when fed to growing pigs. *Current Developments in Nutrition*, 3(2), nzy083.
<https://doi.org/10.1093/cdn/nzy083>
- Duangnumswang, Y., Zentek, J., Goodarzi Boroojeni, F., Bose, T., Ermund, A., Lu, L., & Boroojeni, G. F. (2021). Development and functional properties of intestinal mucus layer in poultry. *Frontiers in Immunology*, 12, 745849.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.745849>
- Fan, M. Z., Sauer, W. C., Hardin, R. T., & Lien, K. A. (1994). Determination of apparent ileal amino acid digestibility in pigs: effect of dietary amino acid level. *Journal of Animal Science*, 72(11). <https://doi.org/10.2527/1994.72112851x>
- Fry, C. (2009). Secretions of the salivary glands and stomach. *Surgery (Oxford)*, 27(12), 503–506. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2009.10.014>
- Fuller, M. (2012). Determination of protein and amino acid digestibility in foods including implications of gut microbial amino acid synthesis. *The British Journal of Nutrition*, 108(Suppl 2), S238–S246. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002279>

- Fuller, M. F., & Reeds, P. J. (1998). Nitrogen cycling in the gut. *Annual Review of Nutrition*, 18, 385–411. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.18.1.385>
- Garlick, P., McNurlan, M., & Patlak, C. (1999). Adaptation of protein metabolism in relation to limits to high dietary protein intake. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(S1), s34–s43. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600742>
- Gelberg, H. B. (2014). Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine. *Toxicologic Pathology*, 42(1), 54–66. <https://doi.org/10.1177/0192623313518113>
- Gutierrez, A., Ceron, J., Fuentes-Rubio, M., Tecles, F., & Beeley, J. (2014). A proteomic approach to porcine saliva. *Current Protein & Peptide Science*, 15(1), 56–63. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140221115704>
- He, L., Wu, L., Xu, Z., Li, T., Yao, K., Cui, Z., Yin, Y., & Wu, G. (2016). Low-protein diets affect ileal amino acid digestibility and gene expression of digestive enzymes in growing and finishing pigs. *Amino Acids*, 48(1), 21–30. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2059-1>
- Hellwing, A. L. F., Tauson, A.-H., & Skrede, A. (2007). Blood parameters in growing pigs fed increasing levels of bacterial protein meal. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-33>
- Isackson, H., & Ashley, C. C. (2014). Secretory functions of the gastrointestinal tract. *Surgery (Oxford)*, 32(8), 396–403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.05.007>
- Jansman, A. J. M., Smink, W., Van Leeuwen, P., & Rademacher, M. (2002). Evaluation through literature data of the amount and amino acid composition of basal endogenous crude protein at the terminal ileum of pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 98(1–2), 49–60. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00015-9)
- Kong, C., & Adeola, O. (2014). Evaluation of Amino Acid and Energy Utilization in Feedstuff for Swine and Poultry Diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(7), 917–925. <https://doi.org/10.5713/ajas.2014.r.02>

- Krone, J. E. C., Agyekum, A. K., ter Borgh, M., Hamonic, K., Penner, G. B., & Columbus, D. A. (2019). Characterization of urea transport mechanisms in the intestinal tract of growing pigs. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 317(6), G839–G844. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00220.2019>
- Kurz, A., & Seifert, J. (2021). Factors influencing proteolysis and protein utilization in the intestine of pigs: A Review. *Animals (Basel)*, 11(12), 3351. <https://doi.org/10.3390/ani11123551>
- Lacroix, M., Bos, C., Léonil, J., Airinei, G., Luengo, C., Daré, S., Benamouzig, R., Fouillet, H., Fauquant, J., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2006). Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(5), 1070–1079. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.5.1070>
- Lamy, E., & Mau, M. (2012). Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4251–4258. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.007>
- Le Gall, M., Quillien, L., Guéguen, J., Rogniaux, H., & Sève, B. (2005). Identification of Dietary and Endogenous Ileal Protein Losses in Pigs by Immunoblotting and Mass Spectrometry. *The Journal of Nutrition*, 135(5), 1215–1222. <https://doi.org/10.1093/jn/135.5.1215>
- Li, J., Tan, B., Tang, Y., Liao, P., Yao, K., Ji, P., & Yin, Y. (2018). Extraction and identification of the chyme proteins in the digestive tract of growing pigs. *Science China Life Sciences*, 61(11), 1396–1406. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9356-1>
- Li, X., Wang, Wenqi., & Chen, J. (2017). Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research. *Science China Life Sciences*, 60(10), 1093–1113. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9175-2>
- Liu, J. B., Yan, H. L., Liao, Y. P., Xie, Z. J., & Yin, Y. L. (2020). Effects of feed intake level on the additivity of apparent and standardized ileal digestibility of amino acids in diets for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 266, 114525. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114525>

- Lugea, A., Waldron, R. T., Mareninova, O. A., Shalbueva, N., Deng, N., Su, H.-Y., Thomas, D. D., Jones, E. K., Messenger, S. W., Yang, J., Hu, C., Gukovsky, I., Liu, Z., Groblewski, G. E., Gukovskaya, A. S., Gorelick, F. S., & Pandol, S. J. (2017). Human pancreatic acinar cells. *The American Journal of Pathology*, *187*(12), 2726–2743. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.017>
- Macelline, S. P., Chrystal, P. V., Liu, S. Y., & Selle, P. H. (2021). The dynamic conversion of dietary protein and amino acids into chicken-meat protein. *Animals*, *11*(8), 2288. <https://doi.org/10.3390/ani11082288>
- Mariscal-Landín, G., & Reis de Souza, T. C. (2006). Endogenous ileal losses of nitrogen and amino acids in pigs and piglets fed graded levels of casein. *Archives of Animal Nutrition*, *60*(6), 454–466. <https://doi.org/10.1080/17450390600973642>
- Mariscal-Landin, G., Seve, B., Colleaux, Y., & Lebreton, Y. (1995). Endogenous amino nitrogen collected from pigs with end-to-end ileorectal anastomosis is affected by the method of estimation and altered by dietary fiber. *The Journal of Nutrition*, *125*(1), 136–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jn/125.1.136>
- McGuckin, M. A., Thornton, D. J., & Whitsett, J. A. (2015). Mucins and mucus. In *Mucosal Immunology: Vol. 1.A* (pp. 231–250). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00014-8>
- McNurlan, M. A., Tomkins, A. M., & Garlick, P. J. (1979). The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. *Biochemical Journal*, *178*(2), 373–379. <https://doi.org/10.1042/bj1780373>
- Miner-Williams, W., Deglaire, A., Benamouzig, R., Fuller, M. F., Tomé, D., & Moughan, P. J. (2014). Endogenous proteins in the ileal digesta of adult humans given casein-, enzyme-hydrolyzed casein- or crystalline amino-acid-based diets in an acute feeding study. *European Journal of Clinical Nutrition*, *68*(3), 363–369. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.270>
- Miner-Williams, W., Moughan, P. J., & Fuller, M. F. (2009). Endogenous Components of Digesta Protein from the Terminal Ileum of Pigs Fed a Casein-Based Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(5), 2072–2078. <https://doi.org/10.1021/jf8023886>

- Modina, S. C., Aidos, L., Rossi, R., Pocar, P., Corino, C., & Di Giancamillo, A. (2021). Stages of gut development as a useful tool to prevent gut alterations in piglets. *Animals*, *11*(5), 1412. <https://doi.org/10.3390/ani11051412>
- Morales, A., Buenabad, L., Castillo, G., Vázquez, L., Espinoza, S., Htoo, J. K., & Cervantes, M. (2017). Dietary levels of protein and free amino acids affect pancreatic proteases activities, amino acids transporters expression and serum amino acid concentrations in starter pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *101*(4), 723–732. <https://doi.org/10.1111/jpn.12515>
- Moter, V., & Stein, H. H. (2004). Effect of feed intake on endogenous losses and amino acid and energy digestibility by growing pigs. *Journal of Animal Science*, *82*(12), 3518–3525. <https://doi.org/10.2527/2004.82123518x>
- Moughan, P. J., & Rutherfurd, S. M. (2012). Gut luminal endogenous protein: Implications for the determination of ileal amino acid digestibility in humans. *British Journal of Nutrition*, *108*(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1017/S0007114512002474>
- Moughan, P. J., Souffrant, W. B., & Hodgkinson, S. M. (1998). Physiological approaches to determining gut endogenous amino acid flows in the mammal. *Archives of Animal Nutrition*, *51*(2–3), 237–252. <https://doi.org/10.1080/17450399809381922>
- Nyachoti, C., de Lange, C., & Schulze, H. (1997a). Estimating endogenous amino acid flows at the terminal ileum and true ileal amino acid digestibilities in feedstuffs for growing pigs using the homoarginine method. *Journal of Animal Science*, *75*(12), 3206–3213. <https://doi.org/10.2527/1997.75123206x>
- Nyachoti, C., de Lange, C., McBride, B., & Schulze, H. (1997b). Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: A review. *Canadian Journal of Animal Science*, *77*(1), 149–163. <https://doi.org/10.4141/A96-044>
- Otani, L., Nishi, H., Koyama, A., Akasaka, Y., Taguchi, Y., Toyoshima, Y., Yamanaka, D., Hakuno, F., Jia, H., Takahashi, S. I., & Kato, H. (2020). Low-arginine and low-protein diets induce hepatic lipid accumulation through different mechanisms in growing rats. *Nutrition and Metabolism*, *17*(60). <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00477-5>

- Pahm, A. A., Pedersen, C., Hoehler, D., & Stein, H. H. (2008). Factors affecting the variability in ileal amino acid digestibility in corn distillers dried grains with solubles fed to growing pigs. *Journal of Animal Science*, *86*(9), 2180–2189. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-0868>
- Park, C. S., & Adeola, O. (2020). Basal ileal endogenous losses of amino acids in pigs determined by feeding nitrogen-free diet or low-casein diet or by regression analysis. *Animal Feed Science and Technology*, *267*, 114550. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114550>
- Piel, C., Montagne, L., Sève, B., & Lallès, J. P. (2005). Increasing digesta viscosity using carboxymethylcellulose in weaned piglets stimulates ileal goblet cell numbers and maturation. *The Journal of Nutrition*, *135*(1), 86–95. <https://doi.org/10.1093/jn/135.1.86>
- Prims, S., van Raemdonck, G., vanden Hole, C., van Cruchten, S., van Ginneken, C., van Ostade, X., & Casteleyn, C. (2019). On the characterisation of the porcine gland-specific salivary proteome. *Journal of Proteomics*, *196*, 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.01.016>
- Qin, C., Qiu, K., Sun, W., Jiao, N., Zhang, X., Che, L., Zhao, H., Shen, H., & Yin, J. (2016). A proteomic adaptation of small intestinal mucosa in response to dietary protein limitation. *Scientific Reports*, *6*(1), 36888. <https://doi.org/10.1038/srep36888>
- Quintana-Hayashi, M., Padra, M., Padra, J., Benktander, J., & Lindén, S. (2018). Mucus-Pathogen interactions in the gastrointestinal tract of farmed animals. *Microorganisms*, *6*(2), 55. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020055>
- Ravindran, V. (2016). Feed-induced specific ileal endogenous amino acid losses: Measurement and significance in the protein nutrition of monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology*, *221*, 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.05.013>
- Ravindran, V. (2021). Progress in ileal endogenous amino acid flow research in poultry. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *12*(5). <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00526-2>

- Ravindran, V., Morel, P., Rutherford, S., & Thomas, D. (2008). Endogenous flow of amino acids in the avian ileum as influenced by increasing dietary peptide concentrations. *British Journal of Nutrition*, *101*(6), 822–828. <https://doi.org/10.1017/S0007114508039974>
- Recoules, E., Sabboh-Jourdan, H., Narcy, A., Lessire, M., Harichaux, G., Labas, V., Duclos, M. J., & Réhault-Godbert, S. (2017). Exploring the in vivo digestion of plant proteins in broiler chickens. *Poultry Science*, *96*(6), 1735–1747. <https://doi.org/10.3382/ps/pew444>
- Regmi, N., Wang, T., Crenshaw, M. A., Rude, B. J., & Liao, S. F. (2018). Effects of dietary lysine levels on the concentrations of selected nutrient metabolites in blood plasma of late-stage finishing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *102*(2), 403–409. <https://doi.org/10.1111/jpn.12714>
- Sarri, L., Balcells, J., Seradj, A. R., & de la Fuente, G. (2024). Protein turnover in pigs: A review of interacting factors. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *108*(2), 451–469. <https://doi.org/10.1111/jpn.13906>
- Schipper, R. G., Silletti, E., & Vingerhoeds, M. H. (2007). Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology*, *52*(12), 1114–1135. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.06.009>
- Sensoy, I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Current Research in Food Science*, *4*, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>
- Shurson, G. C., & Kerr, B. J. (2023). Challenges and opportunities for improving nitrogen utilization efficiency for more sustainable pork production. *Frontiers in Animal Science*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fanim.2023.1204863>
- Sibbald, I. R. (1987). Estimation of bioavailable amino acids in feedingstuffs for poultry and pigs: A review with emphasis on balance experiments. *Canadian Journal of Animal Science*, *67*(2), 221–300. <https://doi.org/10.4141/cjas87-028>
- Souffrant, W., Rérat, A., Laplace, J., Darcy-Vrillon, B., Köhler, R., Corring, T., Gebhardt, G., Bernard, F., Jähnichen, M., Schneider, B., & Cointepas, F. (1993). Exogenous and

- endogenous contributions to nitrogen fluxes in the digestive tract of pigs fed a casein diet. III. Recycling of endogenous nitrogen. *Reproduction Nutrition Development*, 33(4), 373–382. <https://doi.org/10.1051/rnd:19930406>
- Starck, C. S., Wolfe, R. R., & Moughan, P. J. (2018). Endogenous Amino Acid Losses from the Gastrointestinal Tract of the Adult Human—A Quantitative Model. *The Journal of Nutrition*, 148(11), 1871–1881. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy162>
- Stein, H. H., Fuller, M. F., Moughan, P. J., Sève, B., Mosenthin, R., Jansman, A. J. M., Fernández, J. A., & de Lange, C. F. M. (2007a). Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. *Livestock Science*, 109(1–3). <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.019>
- Stein, H. H., Sève, B., Fuller, M. F., Moughan, P. J., & de Lange, C. F. M. (2007b). Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *Journal of Animal Science*, 85(1), 172–180. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-742>
- Tancharoenrat, P., Zaefarian, F., & Ravindran, V. (2022). Composition of chicken gallbladder bile. *British Poultry Science*, 63(4), 548–551. <https://doi.org/10.1080/00071668.2022.2044451>
- Taverner, M. R., Hume, I. D., & Farrell, D. J. (1981). Availability to pigs of amino acids in cereal grains. *British Journal of Nutrition*, 46(1), 149–158. <https://doi.org/10.1079/BJN19810017>
- Thacker, P. A., Bowland, J. P., Milligan, L. P., & Weltzien, E. (1982). Effects of graded dietary protein levels on urea recycling in the pig. *Canadian Journal of Animal Science*, 62(4), 1193–1197. <https://doi.org/10.4141/cjas82-139>
- Tröscher-Mußotter, J., Tilocca, B., Stefanski, V., & Seifert, J. (2019). Analysis of the Bacterial and Host Proteins along and across the Porcine Gastrointestinal Tract. *Proteomes*, 7(1), 4. <https://doi.org/10.3390/proteomes7010004>
- Wang, J., Li, D., Dangott, L. J., & Wu, G. (2006). Proteomics and Its Role in Nutrition Research1,2. *The Journal of Nutrition*, 136(7), 1759–1762. <https://doi.org/10.1093/jn/136.7.1759>

- Wang, J., Xiao, Y., Li, J., Qi, M., & Tan, B. (2021). Serum biochemical parameters and amino acids metabolism are altered in piglets by early-weaning and proline and putrescine supplementations. *Animal Nutrition*, 7(2), 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.007>
- Wang, L., Chen, M., He, R., Sun, Y., Yang, J., Xiao, L., Cao, J., Zhang, H., & Zhang, C. (2017). Serum creatinine distinguishes Duchenne muscular dystrophy from Becker Muscular Dystrophy in patients aged ≤ 3 years: A retrospective study. *Frontiers in Neurology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00196>
- Watford, M. (2003). The urea cycle: Teaching intermediary metabolism in a physiological setting. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 31(5), 289–297. <https://doi.org/10.1002/bmb.2003.494031050249>
- Wykes, L. J., Fiorotto, M., Burrin, D. G., Del Rosario, M., Frazer, M. E., Pond, W. G., & Jahoor, F. (1996). Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. *The Journal of Nutrition*, 126(5), 1481–1488. <https://doi.org/10.1093/jn/126.5.1481>
- Xue, P. C., Adeola, O., & Ragland, D. (2014). Determination of additivity of apparent and standardized ileal digestibility of amino acids in diets containing multiple protein sources fed to growing pigs. *Journal of Animal Science*, 92(9), 3937–3944. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7815>
- Yang, Z., Urriola, P. E., Johnston, L. J., & Shurson, G. C. (2023). A systems approach to evaluate nitrogen utilization efficiency and environmental impacts of swine growing-finishing feeding programs in U.S. pork production systems. *Journal of Animal Science*, 101. <https://doi.org/10.1093/jas/skad188>
- Yin, J., Li, Y., Zhu, X., Han, H., Ren, W., Chen, S., Bin, P., Liu, G., Huang, X., Fang, R., Wang, B., Wang, K., Sun, L., Li, T., & Yin, Y. (2017). Effects of Long-Term Protein Restriction on Meat Quality, Muscle Amino Acids, and Amino Acid Transporters in Pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(42), 9297–9304. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02746>
- Zaefarian, F., Abdollahi, M., Cowieson, A., & Ravindran, V. (2019). Avian Liver: The Forgotten Organ. *Animals (Basel)*, 9(2), 63. <https://doi.org/10.3390/ani9020063>

- Zhang, Y., Li, D., Fan, S., Piao, X., Wang, J., & Han, I. K. (2002). Effects of casein and protein-free diets on endogenous amino acid losses in pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *15*(11), 1634–1638. <https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1634>
- Zhang, J., Gao, Y., Lu, Q., Sa, R., & Zhang, H. (2017). Proteome changes in the small intestinal mucosa of growing pigs with dietary supplementation of non-starch polysaccharide enzymes. *Proteome Science*, *15*, 3. <https://doi.org/10.1186/s12953-016-0109-6>
- Zhou, H., Wu, W., Mahmood, Tahir., Chen, Yanhong., Xu, Yanwei., Wang, Youli., & Yuan, Jianmin. (2022). Comparison of endogenous amino acid losses in broilers when offered nitrogen-free diets with differing ratios of dextrose to corn starch. *Scientific Reports*, *12*, 5689. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09746-0>