



Métodos de evaluación de productos ruminalmente protegidos

En este estudio nos centramos en los distintos métodos que existen para calcular la biodisponibilidad de un producto, pues no solo debemos procurar que esta sea elevada sino que su cálculo se obtenga a través de los métodos más fiables, que analizamos a continuación.

Javier López

Gerente del Servicio Técnico de Ruminantes Sur de Europa
Animal Nutrition & Health Emena
Kemin Industries

INTRODUCCIÓN

En los últimos años hemos asistido a un incremento muy significativo de la cantidad de leche que producen diariamente las vacas, pero, a medida que los rendimientos productivos van aumentando, también lo hacen las necesidades nutritivas, con lo que es necesario buscar herramientas que nos ayuden a satisfacer los crecientes requerimientos de estos animales de la manera más eficiente y precisa posible, a fin de asegurar

su bienestar y la sostenibilidad de las explotaciones.

En lo que a la nutrición proteica se refiere, debo cubrir los requerimientos de ciertos aminoácidos esenciales (metionina y lisina) y para ello es imprescindible la incorporación en la dieta de productos tecnológicos consistentes en metionina y lisina protegidos para evitar la degradación ruminal.

Es por esta creciente demanda que en los últimos años han aparecido en el mercado multitud de productos con distintas tecnologías de encapsulación y, por tanto, con características técnicas muy diversas.

Para que este tipo de productos tengan una buena calidad deben asegurar que un alto porcentaje del ingrediente activo pase al rumen sin sufrir degradación y que, además, presente una posterior elevada digestibilidad intestinal. Solo con estas dos características podremos conseguir una elevada “verdadera biodisponibilidad” del aminoácido.

El término ‘biodisponibilidad’ es clave para poder entender las diferencias entre los productos disponibles en el mercado. Es la cantidad de metionina o lisina que es realmente digerida y absorbida en el intestino delgado y que es potencialmente utilizada por el animal por unidad de producto ingerido. Por ejemplo, si decimos que un producto de metionina tiene un 50 % de biodisponibilidad, quiere decir que, por cada 100 g de producto, 50 serán absorbidos en el intestino y están disponibles para ser utilizados por el animal.

Para que un producto sea altamente biodisponible debe cumplir dos requisitos básicos:

- 1) Elevado porcentaje de producto que atraviesa el rumen sin sufrir degradación o alteración.

2) Que un alto porcentaje de producto sea digerido y absorbido en el intestino. Este segundo aspecto es igualmente importante, ya que un producto puede estar bien protegido ante la degradación ruminal, pero no digerirse posteriormente en el intestino, con lo cual se excretaría en heces sin ser aprovechado por el animal.

Para conseguir una elevada biodisponibilidad los productos deben poseer varias características técnicas:

- 1) Alta concentración del nutriente específico: AA
- 2) Elevada gravedad específica y tamaño de partícula adecuado a esa gravedad específica para que abandonen el rumen lo antes posible y se minimice la degradación. No es cuestión de sobreproteger el producto, es un equilibrio entre el tipo y la cantidad de protección en función del tiempo que el producto esté en tránsito en el rumen a fin de asegurar su resistencia sin comprometer su posterior digestión.
- 3) Recubrimiento adecuado para resistir no solo la degradación ru-

minal mencionada anteriormente sino que además deben resistir adecuadamente los distintos procesos y acciones mecánicas que puede sufrir a lo largo de todo el proceso, desde la inclusión inicial en el alimento hasta la ingesta por parte del animal (procesos de mezclado y tratamiento en fábricas de pienso o Premix, estabilidad en la ración final (TMR), masticación por el animal...).

- 4) Luego el nutriente esencial debe estar disponible lo antes posible en el abomaso para poder garantizar su máxima absorción en el intestino delgado.

CÓMO CALCULAR LA BIODISPONIBILIDAD DE UN PRODUCTO

A continuación nos centraremos en los distintos métodos que existen para calcular la biodisponibilidad de un producto, ya que no solo debemos procurar que el producto que usamos tenga una elevada biodisponibilidad, además debemos asegurarnos de que el cálculo de esta sea obtenido ►►

► ES IMPRESCINDIBLE LA INCORPORACIÓN EN LA DIETA DE PRODUCTOS TECNOLÓGICOS CONSISTENTES EN METIONINA Y LISINA PROTEGIDOS PARA EVITAR LA DEGRADACIÓN RUMINAL

WWW.EMBRIOMARKET.COM

981 791 843 | 649 239 488



EmbrioVet



EmbrioMarket

**CONSÚLTANOS
SIN COMPROMISO**



**ESPECIALISTAS EN
TRANSFERENCIA EMBRIONARIA
IN VIVO E IN VITRO**

Sara Martínez



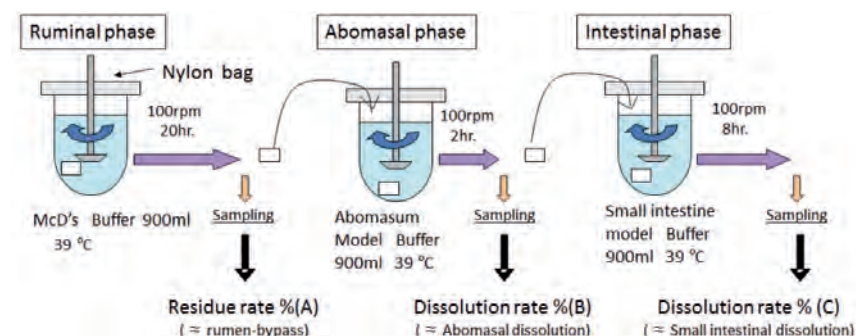
Sara Martínez

**TRABAJAMOS POR TU ÉXITO PARA SEGUIR
CRECIENDO JUNTOS**

- EQUIPO AUTORIZADO EXPORTACIÓN ESIIET05B
- BANCO DE EMBRIONES
- LABORATORIO FIJO
- LABORATORIOS MÓVILES
- PROGRAMAS GENÉTICOS PERSONALIZADOS

- ASPIRACIÓN FOLICULAR (OPU)
- TRANSPORTE DE OVOCITOS
- FERTILIZACIÓN DE OVOCITOS (FIV)
- TRASLADO EN INCUBADORES
- TRANSFERENCIA EMBRIONES

- PROFESIONALIDAD
- INTEGRIDAD
- PROYECTOS ADECUADOS A TUS NECESIDADES
- SERVICIO COMPLETO EN TU EXPLOTACIÓN
- ESPAÑA Y PORTUGAL

Figura 1. Esquema de método *in vitro* de tres fases

Miura Makoto, comunicación personal

por un método lo más fiable posible, es decir, que el dato que nos aporte el fabricante sea lo más semejante a la realidad como sea posible. Para ello existen básicamente tres tipos de métodos: *in vitro*, *in situ* e *in vivo*.

Métodos *in vitro*

Los métodos *in vitro* son pruebas realizadas en laboratorio donde se simula un ambiente ruminal e intestinal para simular la degradación ruminal y digestibilidad intestinal. Algunos de los métodos utilizan líquido ruminal recogido de ovejas o vacas, mientras que otras usan modificadores de pH para imitar el ambiente ruminal (Mbanzamihigo *et al.* 1997; Ross *et al.*, 2013; Miyazawa *et al.*, 2014; Larson *et al.*, 2015); Mbanzamihigo y col. (1997).

En esta técnica se incuba el producto simulando un ambiente ruminal durante un tiempo fijo, a continuación se simula un ambiente abomasal y, por último, un ambiente intestinal para valorar la liberación en esta fase (figura 1).

Estos métodos son muy utilizados porque son rápidos, sencillos y económicos, pero no nos facilitan un dato fiable sobre biodisponibilidad, entre otros aspectos, no tienen en cuenta la tasa de paso de los distintos productos, ya que presentan un tiempo fijo de incubación. Otras limitaciones significativas son que no tienen en cuenta las diferencias entre animales y que considera que todos los AA presentes en la fase intestinal son absorbidos por el animal.

Este método es una buena herramienta en las primeras fases de desarrollo de un producto, para discriminar entre productos en función de dichos resultados *in vitro*. Si un pro-

ducto solo nos ofrece datos *in vitro*, debemos tener en cuenta sus muchas limitaciones y la baja precisión con la que trabajaríamos en nuestra formulación.

Métodos *in situ*

Los métodos *in situ* consisten en la incubación ruminal a través de cánulas ruminales de bolsas de nailon generalmente a un tiempo fijo (dependiendo del ingrediente puede ser 6, 8, 16 o 24 horas). Una vez transcurrido este tiempo, se retiran del rumen y se lavan con agua fría hasta que salga limpia. Posteriormente se transfieren a un recipiente que contiene HCL-pepsina a 39 °C y ahí se mantienen durante 2,5 horas para simular las condiciones del abomaso. Posteriormente se meten en bolsas más pequeñas y se introducen en el duodeno a través de una cánula intestinal. Las bolsas se recuperan en las heces y se lavan hasta que el agua salga limpia y la biodisponibilidad se calcula como porcentaje de AA que escapa al rumen x porcentaje de AA que desaparece en el intestino.

Este método, aunque es más fiable que el *in vitro*, sigue teniendo considerables limitaciones:

- No estima el rozamiento contra las paredes del rumen.
- No simula los tiempos reales de paso por el rumen (diferentes entre productos).
- No estima la masticación ni la rumia.
- No mide la digestibilidad intestinal. Puede sobrevalorarla debido a que esta se calcula como la diferencia entre la cantidad que pasa el rumen, menos la cantidad que aparece en heces, sin tener en cuenta qué parte del producto puede no ser absorbido en el intestino delgado.

▶ SI DECIMOS QUE UN PRODUCTO DE METIONINA TIENE UN 50 % DE BIODISPONIBILIDAD, QUIERE DECIR QUE, POR CADA 100 G DE PRODUCTO, 50 SERÁN ABSORBIDOS EN EL INTESTINO Y ESTÁN DISPONIBLES PARA SER UTILIZADOS POR EL ANIMAL

Métodos *in vivo*

Los métodos *in vivo* son los más fiables y tienen la ventaja de que proporcionan estimaciones reales de biodisponibilidad en los animales para los que están destinados, ya que se realizan en condiciones de campo. Dentro de este tipo de métodos, en esta publicación nos centraremos en los tres más comunes:

- Área bajo la curva (Robert *et al.*, 1997; Graulet *et al.*, 2005; Devillard *et al.*, 2011; Faivre *et al.*, 2013; Evans *et al.*, 2013)
- Respuesta de AA libre en plasma (Rulquin y Kowalczyk, 2003; Borucki Castro *et al.*, 2008; Hanigan *et al.*, 2009)
- Respuesta de AA libre en plasma (Whitehouse, 2017)

Método área bajo la curva

Este método utiliza vacas lactantes o secas canuladas ruminalmente, que han sido adaptadas con catéteres yugulares para extracción de sangre. Se toman muestras de sangre iniciales antes de la suplementación con AA, generalmente a las -24, -12, -6 y 0 con el objetivo de establecer valores basales para la concentración plasmática de la prueba AA. Los animales reciben los tratamientos ▶



KESSENT[®]

INSPIRING SUSTAINABLE FARMING



ESTAMOS INTRODUCIENDO
NUESTROS NUEVOS
SUPLEMENTOS DE METIONINA
DE DESARROLLO PROPIO PARA
UN MEJOR EQUILIBRIO
DE AMINOÁCIDOS

Kemin se enorgullece
de liderar el camino con
la mayor biodisponibilidad
de metionina del mercado.



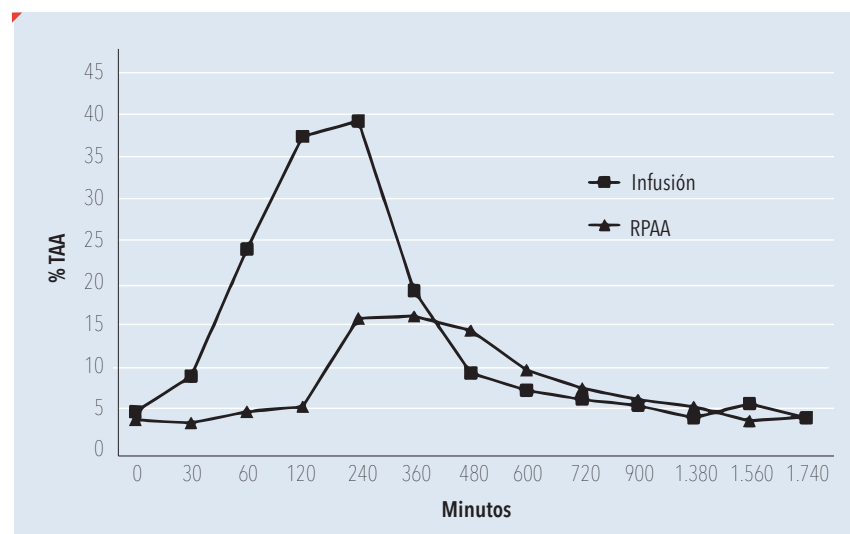
www.kemin.com/kessent

KEMIN[®]

La gama de productos KESSENT estará disponible en el mercado a partir del 1 de enero de 2020.

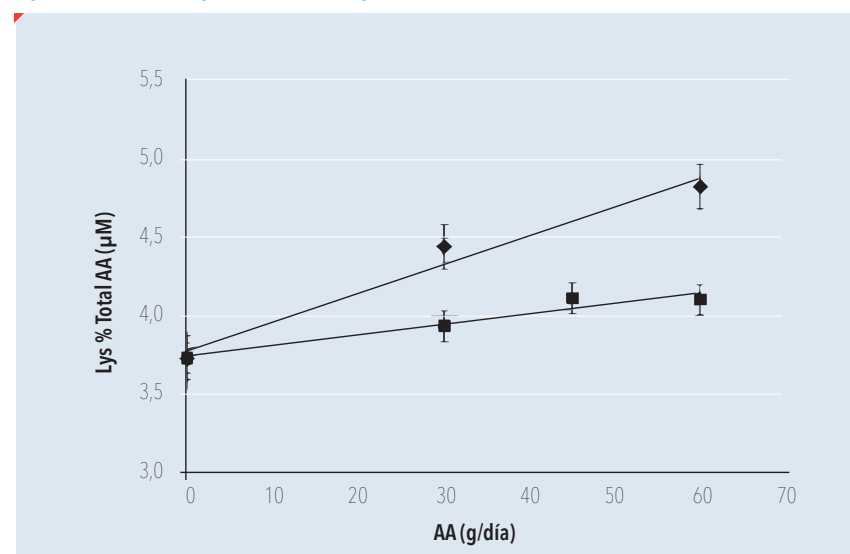
© 2019 Kemin Industries, Inc. y su grupo de empresas. Todos los derechos reservados. ® Marcas de Kemin Industries, Inc., EE.UU.

Figura 2. Ejemplo de área bajo la curva



► LOS MÉTODOS *IN VIVO* SON LOS MÁS FIABLES Y TIENEN LA VENTAJA DE QUE PROPORCIONAN ESTIMACIONES REALES DE BIODISPONIBILIDAD EN LOS ANIMALES PARA LOS QUE ESTÁN DESTINADOS

Figura 3. AA libre en plasma (dosis-respuesta)



AA como una dosis de pulso. Para el tratamiento de control positivo, el AA se administra mediante infusión abomasal. El aminoácido protegido (RPAA) es generalmente proporcionado como una dosis en bolo a través de la cánula ruminal. Para la infusión, la dosis completa de AA es infundida dentro de las primeras 2 h del periodo de recolección de sangre. Luego se toman muestras generalmente cada 1 o 2 h durante las primeras 14 horas; después, menos frecuentes hasta 48 o 72 h tras la dosificación para garantizar que haya un retorno a las concentraciones de referencia. Todas las muestras de plasma son analizadas para el AA de interés. Los valores de referencia para cada vaca se promedian

juntos y restados de los valores obtenidos después de la suplementación (Graulet *et al.*, 2005). La resultante de los valores se grafica y el análisis de área bajo la curva trapezoidal elemental se realiza multiplicando la media de la concentración de AA aumenta entre 2 tiempos de muestreo consecutivos y la duración del intervalo. El área bajo la curva total es la suma del área bajo la curva elemental calculado (Graulet *et al.*, 2005).

Una de las principales limitaciones del área bajo la curva es que los animales reciben una gran dosis (pulso) tanto de RPAA como de tratamientos de infusión, cantidades que no se encontrarían en condiciones normales de alimentación. Otra limitación es que el animal no consume

el RPAA expuesto al TMR. La dosis de pulso generalmente se deposita directamente a través de la cánula ruminal en el rumen al nivel de la fase líquida justo debajo del material fibroso (Graulet *et al.*, 2005), lo que probablemente resulte en que fluya fuera del rumen más rápido que si se alimentara en condiciones normales. Las estimaciones de biodisponibilidad están relacionadas linealmente con la cantidad de dosis de pulso, con dosis más altas se tienen concentraciones de AA más alto en plasma sanguíneo (Graulet *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2013).

Respuesta de AA libre en plasma

El método de respuesta a la dosis de AA libre de plasma es un método

Tabla 1. Recomendaciones para determinar la biodisponibilidad relativa (RBV) de los suplementos de AA protegidos con el rumen (RP-AA) utilizando la técnica de dosis-respuesta AA sin plasma

Diseño experimental	Cuadrado latino replicado con todos los tratamientos en el mismo cuadrado para minimizar la variación.
Los animales	Vacas lecheras con lactancia canulada ruminalmente, preferiblemente con DMI y DIM similares. Evite las vacas en la lactancia temprana debido al balance negativo de energía y proteínas.
Dieta basal	Una TMR balanceada para cumplir con los requisitos nutricionales de los animales alimentados 3 veces al día en intervalos de 8 h.
Período de covarianza	Recolecte muestras de leche y de sangre durante los 3 días del período de covariable para obtener datos de referencia.
Tratamiento	Se recomienda el uso de 3 cantidades (por ejemplo, 0, 30 y 60 g/d) de AA con infusión abomasal o duodenal y las mismas cantidades de AA alimentados con los suplementos de RP-AA.
Infusión	Mezcle y disuelva el AA en un mínimo de 4 L de agua tibia del grifo, e infunda continuamente en el abomaso o duodeno. Las velocidades de infusión de la bomba deben controlarse regularmente para garantizar una administración diaria uniforme y completa de la infusión.
Alimentación RP-AA	Mezcle RP-AA con 1,5 kg de TMR, colóquelo en un recipiente de plástico con tapas y almacénalo a 4 ° C durante 8 h antes de la alimentación para exponer los suplementos probados a condiciones TMR. Coloque la mezcla TMR/RP-AA en cubas de goma y ofrézcala a las vacas 30 minutos antes de la hora de alimentación real. Si la mezcla no se consume por completo en 15 minutos, coloque las sobras directamente en el rumen con una cánula.
Duración del período	Mínimo de 7 d.
Muestra de sangre	Recolecte 4 muestras de sangre (venas coccígeas o yugulares) a intervalos de 2 h luego de la alimentación matutina durante los últimos 3 días de cada período de muestreo.
Análisis atípico	Realice un análisis univariado para determinar valores atípicos en la concentración plasmática de AA, incluido AA.
Cálculo de RBV	Divida la pendiente del suplemento alimentado por RP-AA por la pendiente del AA infundido y multiplíquelo por 100.

más directo porque identifica cambios en las concentraciones plasmáticas de AA a medida que se suministran cantidades crecientes de un AA. Uno de los criterios para el método de respuesta a la dosis de AA libre de plasma es que exista una relación lineal entre las cantidades de AA alimentado o infundido y la concentración de AA en el plasma (a medida que se aumenta la dosis de AA suministrado, debe incrementarse la concentración de ese AA en plasma sanguíneo). Esta linealidad se ha demostrado tanto entre rangos de deficiencia de AA como en rangos con aportes superiores a los requerimientos.

Este método consiste en evaluar las cantidades de AA libre en plasma sanguíneo, a medida que vamos aumentando las cantidades de AA suministradas. Se hace una infusión de agua en el duodeno como grupo control, para conocer los niveles basales de AA. Luego se suministran infusiones de AA al duodeno para calibrar una curva para cada animal, después dos veces al día se colocaron los RPAA en niveles similares a los que se infunden al duodeno. Se tomaron muestras de sangre cada hora durante doce horas el último día de cada tratamiento (día 4). En este día se alcanza una concentración estable de AA que no varía después.

La fuerza de este método, en comparación con otros, es que proporciona valores obtenidos de animales.

En la gráfica 3 podemos observar los incrementos de concentración de AA a medida que aumentamos la suplementación. La curva con mayor pendiente representa el crecimiento en la concentración de AA a medida que incrementamos la cantidad de AA infundido y la de menor pendiente representa el aumento en la suplementación de aminoácido ruminalmente protegido. La relación entre ambas pendientes representa la biodisponibilidad relativa del producto objeto de estudio.

Respuesta de AA libre en plasma (Whitehouse, 2017)

Este método es una evolución del método anterior propuesto por Rulquin y Kowalczyk, 2003. Es en la actualidad el método más fiable disponible, ya que para su ejecución presenta unos requisitos mucho mayores que el anterior, aunque solo algunas universidades de referencia tienen esta técnica implementada y disponible. Por otro lado, requiere de una elevada inversión que solo empresas muy rigurosas y muy seguras de la calidad de sus productos se atreven a acometer. En la tabla 1 se explican los principales puntos que deben cumplirse para testar un producto bajo este método.

CONCLUSIONES

Hemos decidido dar el paso y formular en base a aminoácidos, nos hemos preparado concienzudamente y entendemos el concepto. Ahora nos enfrentamos al momento de tomar la decisión de comprar un determinado producto de AA protegido ruminalmente para cubrir las necesidades que mi sistema me demanda. Lo más importante es no solo tener en cuenta la biodisponibilidad que declara el fabricante, sino también los métodos de validación de esa biodisponibilidad.

Tal y como hemos comentado, el método más fiable es este último, pero dado que es muy caro y laborioso no todas las compañías asumen el riesgo que ello conlleva, con lo que deciden no evaluar con el máximo rigor o no someter la calidad sus productos a los más estrictos criterios científicos. ■



De izquierda a derecha: madre de PRINCE: ABS 7484 Anna-ET GP-84 (Beth Herges), 5ª madre de KINETIC: Clear-Echo M-O-M 2150-ET VG-8
hermana completa de la madre de CAMARO: De-Su Frazzled 6984-ET (Beth Herges) y hermana completa de SHIMMER*RC: K&L SV SUNNY



ABS PROGENEX, C/ Rafael Bergamín 16A, local 4, 28043 - Madrid
Email: ABS-Progenex@genusplc.com
Teléfono: 91 483 49 30 - Fax: 91 510 09 89

ABS REPRESENTA LA Nueva ERA EN SEMEN SEXADO

¡Sexcel® Sexed Genetics combina nuestra tecnología de vanguardia con la genética líder del sector para ofrecerle los mejores resultados!



29H019010

PRINCE

YODA x YODER x EMBASSY

+846 +2890
C M \$ G T P I®

29H019309

KINETIC

KENOBI x ACHIEVER x SPARK

+1949 +2867
L E C H E G T P I®

29H019302

CAMARO

CRIMSON x FRAZZLED x DELTA

+785 +2830
N M \$ G T P I®

29H017442

SHIMMER*RC

SALVATORE RC x RUBICON x CASHCOIN

+1801 +1,98
L E C H E T I P O



7 (Beth Herges),
RED (Alex Arkink)

POWERED BY
IntelliGen
TECHNOLOGIES