

258

Las pérdidas endógenas hasta el íleon del cerdo. 2. Métodos de determinación

Pascal Leterme

*Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira
Departamento de Producción Animal
A.A. 237 Palmira -Valle- Colombia
e-mail: johan@uniweb.net.co*

COMPENDIO

La determinación del flujo de proteínas endógenas que llegan al fin del intestino delgado del cerdo requiere: 1) un acceso permanente a la luz intestinal y 2) técnicas que permiten diferenciar entre las proteínas endógenas y alimenticias presentes en el contenido intestinal. El presente artículo revisa las diferentes técnicas quirúrgicas disponibles para acceder a la luz intestinal así como los métodos de determinación de los flujos endógenos hasta el íleon del cerdo. La técnica de dieta sin proteínas es el método indirecto más utilizado, pero permite estimar solamente las pérdidas basales, independientes del alimento ingerido. Los métodos directos se basan en la utilización del nitrógeno-15, isótopo estable del nitrógeno que permite distinguir entre el nitrógeno endógeno y el alimenticio. Cada método presenta ventajas y desventajas que se discuten en el presente artículo.

Palabras claves: cerdo, proteínas, pérdida endógena.

The ileal endogenous losses in pigs 2. Methods of determination

ABSTRACT

The determination of the endogenous protein flow at the ileum level of the pig requires: 1) a permanent access to the intestine and 2) techniques that allow distinguishing between endogenous and dietary proteins present in the intestine. The present paper revises the different surgery techniques available to get access to the lumen and the different methods for endogenous protein flow determination. The N-free diet technique is the most utilized but allows only the determination of the basal losses, i.e. those independent from the diet. The direct methods are based on the use of nitrogen-15, a stable isotope of nitrogen, that allows distinguishing between the endogenous and dietary nitrogen. Each method presents advantages and inconvenients that are discussed in the paper.

Keywords: pig, protein, endogenous loss

Introducción

En 1973, la polaca Zebrowska demostró que el intestino grueso es incapaz de absorber aminoácidos (AA). De esta constatación y de la que este órgano alberga una abundante microflora, surgió la idea de que la digestibilidad de los AA debe medirse al final del intestino delgado, es decir el íleon. La comparación de valores de digestibilidad medidas

a nivel ileal y fecal confirmaron la hipótesis: la fermentación microbiana modifica la cantidad de AA que sale del intestino delgado y cambia también su perfil (Sauer et al., 1982). Resulta una sobreestimación de la digestibilidad de los AA y una subestimación de la metionina.

A partir de este momento se desarrollaron diferentes técnicas para alcanzar la luz intestinal del íleon que les describimos a continuación. También, los investigadores se dieron cuenta de que los contenidos intestinales recolectados constituían una mezcla de proteínas alimenticias y endógenas y que era necesario distinguirlas para luego calcular la digestibilidad real de las proteínas alimenticias. Hasta finales de los años 80, las pérdidas se medían por medio de la técnica de la dieta libre de nitrógeno, por su sencillez, su bajo costo y porque se consideraba que las pérdidas endógenas son constantes. Sin embargo, la llegada de la técnica de dilución isotópica con nitrógeno-15 (^{15}N), desarrollada en Alemania del Este por Gebhardt et al., (1977) y Souffrant et al., (1982), permitió darse cuenta de que, al contrario, las pérdidas son muy variables y dependen de numerosos factores, especialmente tróficos. En los años 90 se desarrollaron varias técnicas para determinar las pérdidas, lo que permitió, a su vez, conocer mejor el papel desempeñado por las pérdidas en el metabolismo proteico del animal. El presente artículo presenta las diferentes técnicas desarrolladas hasta la fecha.

Técnicas de recolección del contenido intestinal

Diferentes técnicas permiten un acceso permanente al contenido intestinal. Cada una presenta ventajas y desventajas. Se pueden distinguir las que permiten una recolección total o parcial del contenido.

Recolección parcial del contenido intestinal

Matanza

Después de ser sacrificado el cerdo, se aísla el fin del íleon y se recoge el contenido con agua. Es costoso y poco confiable. Existe una gran variabilidad de tránsito intestinal entre individuos y el muestreo es poco representativo. Además, la matanza causa la descamación rápida de las células epiteliales, lo que aumenta aún más la manipulación del intestino (Laplace, 1971; Low, 1977).

Cánula en T

Es la más sencilla y más utilizada. Consiste en un tubo que da acceso lateral al intestino (*Figura 1*). El mayor problema es también la falta de representatividad de las muestras, especialmente con dietas fibrosas porque ocurre una segregación entre nutrientes en el intestino, lo que puede favorecer la separación entre las fases sólida y

líquida a nivel de la cánula. Eso afecta también la distribución del marcador y la estimación del flujo. Es muy popular, pero debe evitarse con alimentos no convencionales ricos en fibras (Schröder et al., 1989; Yin et al., 1991).

Cánula post-valvular en T (PVCT)

Se corta el ciego y, en su lugar, se coloca una cánula en T que permite recoger directamente el contenido intestinal que viene del íleon. Si la cánula está cerrada, el contenido continúa hacia el intestino grueso, y si está abierta, la mayoría del contenido se va por la cánula y puede recolectarse (*Figura 1*). La ventaja es la de recoger muestras después del esfínter íleo-cólico. Sin embargo, no es seguro que se obtenga toda el material proveniente del intestino delgado. Por esta razón se necesita el uso de un marcador y se encuentran también problemas con alimentos fibrosos (Van Leeuwen et al., 1991; Köhler et al., 1992a, b; Leterme P., Séve, B., 1998).

Recogida total del contenido intestinal

Cánula re-entrante

Se corta el íleon terminal y se coloca en cada extremo cortado una cánula que se extrae a través de la pared abdominal del cuerpo. A continuación se unen los tubos formando un puente exterior al animal (*Figura 1*). El contenido intestinal debe transitar por el tubo. Cuando se necesitan muestras, se desconectan los tubos y se recoge la digesta proveniente del intestino delgado. Esta cánula es poco utilizada debido a los problemas incessantes de bloqueo que se encuentran; además, los movimientos del intestino son insuficientes para sobrepasar el tubo (Sauer y de Lange, 1992; Darcy et al., 1980; Köhler et al., 1990; Low, 1977).

Anastomosis íleo-rectal

Se corta el íleon terminal, se cierra el intestino grueso a nivel del recto y se une el íleon con el recto ligándolos, de tal manera que el material recogido en el ano viene del intestino delgado (*Figura 1*). Se coloca una cánula en T en el intestino grueso para la evacuación de los gases de fermentación. Es la única técnica que permite trabajar con alimentos ricos en fibras. La desventaja es que se

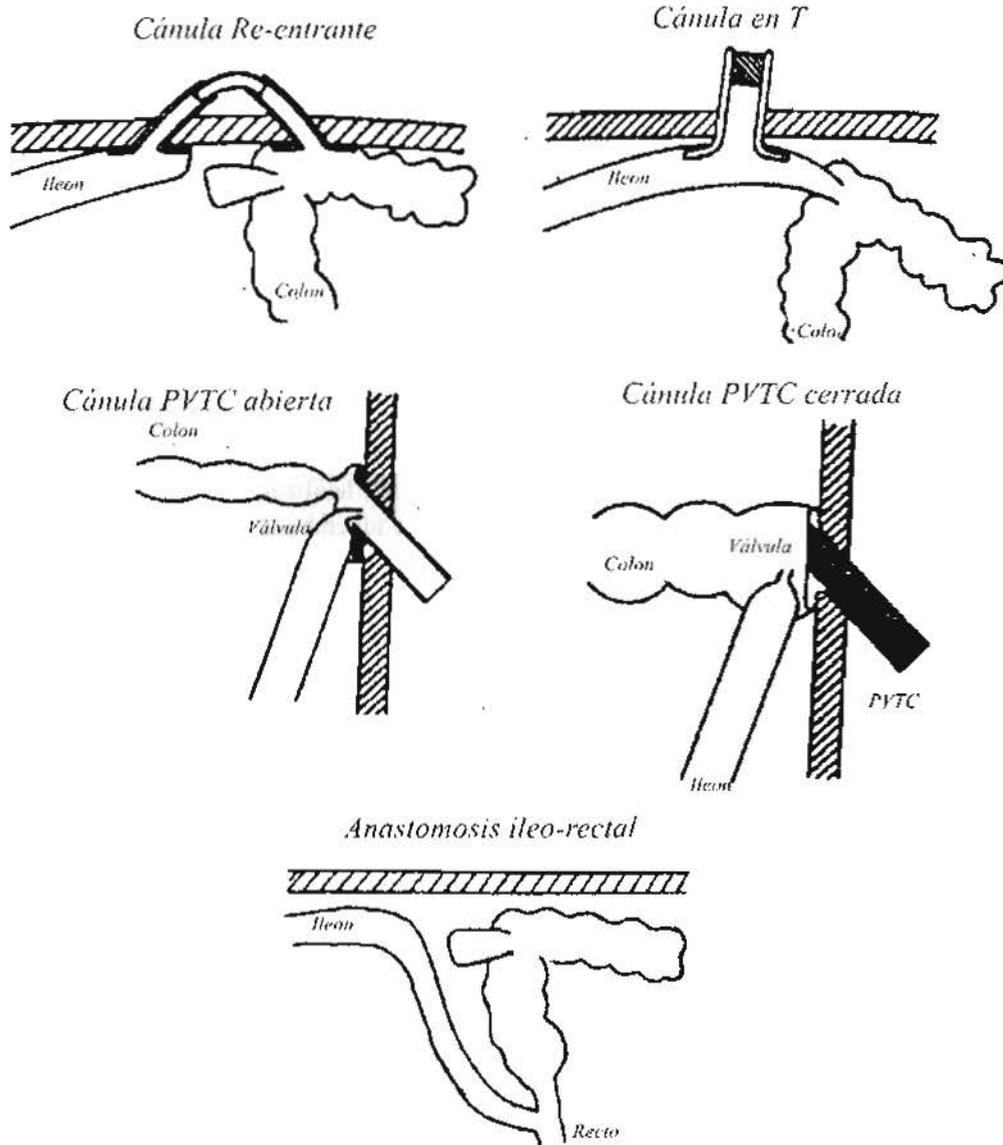


Figura 1. Técnicas de cannulación o de anastomosis ileo - rectal en el cerdo (Fuente: ILOBTNO, Wageningen, Países bajos).

puede desarrollar una microflora al final del intestino. Además, el riesgo de perder animales durante la operación de cirugía es más grande, los animales son más frágiles y se debe suplementar su dieta en energía y en vitamina K para compensar la pérdida del intestino grueso. El cerdo necesita también mucho más agua para beber (Laplace et al., 1985; Green, 1988; Köhler et al., 1992a,b; Hennig et al., 1986, 1988, 1989).

Comparación de los métodos

La comparación de diferentes técnicas realizada por Fuller et al., (1994) ilustra bien la importancia de la metodología sobre los resultados de digestibilidad (Tabla 1).

La representatividad del muestreo tiene una influencia determinante. Se puede reducir mucho la variabilidad cuando aumenta el número de comidas y la frecuencia de recolección. El ideal es que se recojan todas las heces durante varios días. Si no es posible, se debe utilizar un marcador indigestible para estimar los flujos de materia (ver más adelante). Sin embargo, existe una interacción significativa entre fibras y marcadores. Normalmente, se debe recuperar todo el marcador pero nunca es el caso en presencia de grandes cantidades de fibras y la tasa de recuperación puede bajar hasta 70 %. En este caso, es mejor utilizar la técnica de anastomosis. Para alimentos más convencionales y, en condiciones óptimas de trabajo, el efecto de la metodología es más reducido (Leterme et al., 1990; Köhler et al., 1990; Yin et al., 1991; Fuller et al., 1994).

Tabla 1. Digestibilidad de las proteínas de diferentes dietas obtenida en diferentes laboratorios y diferentes técnicas de colecta de contenido intestinal (%).

Fuente de proteínas	Cebada	Cebada + Leche (polvo)	Leche (polvo)
Anastomosis (laboratorio I)	67	66	77
Anastomosis (laboratorio II)	63	63	79
Anastomosis (laboratorio III)	63	72	80
T-cannula	59	76	79
PVTC	-	84	85

Fuente: Fuller et al., (1994)

Se debe tomar en cuenta también la existencia de una variabilidad natural entre animales o entre laboratorios (Elbers et al., 1989). Es necesario disponer de un número suficiente de animales por dieta a estudiar. Low (1977) estimó que se necesitan los resultados obtenidos con 10 cerdos durante 96 h para que la probabilidad de evidenciar una diferencia de digestibilidad significativa entre dos dietas sea de 95 % ($P < 0.05$). Goedhart (1990) señala también la importancia del diseño experimental. Para él, se debe evitar el cuadrado latino en pruebas de digestibilidad para evitar una interacción «periodo x animal» importante.

Determinación de los flujos de digesta en el íleon

Estimación del flujo de nutrientes

Cuando la recolección es parcial, se requiere el uso de un marcador indigestible para estimar el flujo de materia excretada por el íleon. El principio es el de suplementar la dieta con una cantidad limitada de marcador, por ejemplo 2 g/kg. Luego se determina la concentración del marcador en los contenidos intestinales y se calcula el flujo de material o digesta por medio de la ecuación siguiente:

$$\text{Flujo de materia seca (g/kg MSI)} = Ma / Mi$$

donde Ma es la concentración del marcador en el alimento en g marcador/kg MSI y Mi la concentración del marcador en el contenido intestinal en g marcador/g materia. Si se dispone de la concentración de la dieta y los contenidos en los diferentes nutrientes, se puede calcular su respectivo flujo y, luego, deducir su digestibilidad ileal aparente. Existen decenas de marcadores pero los más utilizados son el óxido de cromo (Cr_2O_3), el óxido de titanio (TiO_2) o las cenizas insolubles en HCl. Un buen marcador debe ser totalmente

indigestible, moverse o transitar con la materia que marca, ser fácil de analizar y ser utilizado en cantidad reducida, para no afectar los procesos de digestión y limitar los costos (Pond et al., 1986).

Si la recolección es total, se puede calcular inmediatamente el flujo de materia y deducir la digestibilidad de los componentes de la dieta.

Composición de la dieta

La mayoría de las materias primas no pueden constituir el único ingrediente de una dieta, pues son desbalanceadas en comparación con los requerimientos del animal y hay problemas de palatabilidad o de toxicidad. Los cereales son las únicas materias primas que el cerdo puede ingerir como tal, sin suplemento, con la excepción de minerales. Sin embargo, los cereales tienen un bajo contenido en proteínas (< 12 %). Eso significa que la proporción de proteínas endógenas en los contenidos intestinales será importante con respecto a la de las proteínas alimentarias indigestibles y que la digestibilidad aparente de las últimas no va a reflejar bien su digestibilidad real (Leterme, 2002).

Para impedir un exceso proteico en la dieta cuando se analizan materias como las tortas, se las mezcla con materias libres de proteínas: almidón, aceite, celulosa. De esta manera, es todavía posible determinar la digestibilidad de las proteínas de los alimentos, pero no la de los otros nutrientes.

En muchos casos, los investigadores prefieren trabajar por diferencia o 'sustitución'. El principio es el de determinar la digestibilidad de una dieta de base. Luego se sustituye parte de la dieta por la materia a estudiar y se determina la digestibilidad de la nueva dieta. Finalmente se calcula, por diferencia, la digestibilidad de la materia sola.

Ejemplo:

Digestibilidad de la dieta de base = 80 %

Digestibilidad de la dieta de prueba (60% dieta de base + 40 % materia a analizar) = 76 %

Digestibilidad de la materia a analizar sola = $76 - (80 \times 0.6)/0.4 = 70 \%$

El principal problema del método por diferencia es la tasa de sustitución a utilizar. Es indispensable aplicar la tasa más alta posible para mejorar la precisión. Con bajas tasas hay un riesgo importante de que la variación observada se deba más a la fluctuación de las pérdidas endógenas y/o a la variación de composición de la dieta. En una serie de experimentos, Sauer et al., (2000) estudiaron la evolución de la digestibilidad de diferentes proteínas a diferentes niveles de sustitución y determinaron el nivel óptimo a utilizar. Estiman, por ejemplo, que se necesitan al menos 150 g de proteína a estudiar/kg dieta para tener una precisión aceptable. Esos autores acaban de publicar una síntesis sobre el tema. Los datos presentados en la **Tabla 2** ilustran el efecto de la metodología sobre la determinación de la digestibilidad del nitrógeno y de los aminoácidos en cerdos.

Por supuesto, el método y la tasa de sustitución van a influir en la medida de las pérdidas endógenas. Cuando la tasa de incorporación de una materia es baja en una dieta semi-sintética, los contenidos intestinales estarán compuestos sobre todo de proteínas endógenas basales y, en cantidad menor, de proteínas alimenticias y de proteínas endógenas específicas de la dieta. La proporción de las dos últimas fracciones se va a incrementar con la tasa de incorporación (Leterme, 2001;

Sauer et al., 2000). Al contrario, se desconoce ampliamente lo que ocurre con el método de sustitución. Desconocemos si las pérdidas endógenas son aditivas o si hay interacción entre los diferentes componentes de la dieta. En un reciente experimento, Dehareng et al., (2000) determinaron las pérdidas endógenas específicas de diferentes materias primas y luego de la mezcla de las últimas, y así concluyeron que las pérdidas endógenas no son aditivas, mientras que la cantidad de proteínas alimenticias digestibles sí lo son.

Determinación de las pérdidas endógenas

Se puede distinguir entre métodos indirectos de determinación y métodos directos, es decir que permiten distinguir entre las proteínas alimenticias y endógenas en los contenidos intestinales.

Métodos indirectos

Dieta libre de proteína

Es la técnica más fácil y más utilizada. El cerdo recibe un alimento compuesto de materias sin proteínas (almidón, azúcar, celulosa, aceite, minerales). Se mide el flujo de nitrógeno o de AA hasta el íleon y, de esta manera, se estiman los flujos endógenos.

Esta técnica permite determinar solamente los flujos endógenos basales porque se corresponden con el nivel mínimo de pérdidas endógenas, ya que la ausencia de proteínas en el alimento disminuye las secreciones y no

Tabla 2. Comparación de digestibilidades del N y de los aminoácidos de arveja y cebada en cerdos determinadas por el método directo o el método de sustitución.

Materia prima Método	Arveja		Cebada	
	Sustitución	Directo	Sustitución	Directo
Amino ácidos esenciales				
Arginina	82.6	82.0	64.7	69.8
Histidina	71.1	74.9	69.5	71.9
Isoleucina	83.4 ^a	72.7 ^b	61.1	66.9
Leucina	78.5 ^a	72.4 ^b	66.6	70.3
Lisina	75.3	75.5	54.1	61.3
Metionina	66.4 ^a	70.9 ^b	-	-
Fenilalanina	72.1	72.6	69.6	72.1
Treonina	64.4	60.6	53.3 ^a	62.4 ^b
Valina	65.8	69.1	62.6	67.2
Nitrógeno	73.7	69.9	56.6	58.9

Fuentes: Arveja: Leterme et al., (1991); 400 g arveja/kg; cebada: Fan y Sauer (1995), 675 g cebada/kg

hay factores que estimulen su producción o impidan su reabsorción por la pared intestinal.

Sin embargo, a pesar de la sencillez del método, las condiciones de utilización varían mucho de un laboratorio al otro. Se observan diferencias importantes a nivel del peso de los cerdos, el tipo de cánula, la cantidad de fibra en la dieta, el tiempo de adaptación a la dieta o de recolección. No es sorprendente constatar que, en estas condiciones, los valores de flujo ileal varíen de 5 a 18 g AA/kg MSI (Leterme, 1995). La mayor variación viene de la glicina y, sobre todo, de la prolina.

La excreción de este último AA aumenta con el número de días en estado de ayuno proteico (ver artículo previo: Leterme, 2001) y puede representar hasta 46 % de la excreción total de AA. Cuando se inyecta una solución de AA libres en la sangre de cerdos que están recibiendo una dieta libre de proteínas, la hiperexcreción de prolina desaparece pero el nivel de pérdidas endógenas no cambia (Leterme et al., 1996).

Para corregir el carácter antifisiológico de la dieta libre de proteínas, Moughan y su equipo propusieron suplementar la dieta con una proteína totalmente digestible, es decir, caseína. Sin embargo, como hay dudas serias sobre la digestión total de esta proteína, los investigadores utilizaron caseína hidrolizada. Este producto estimula las secreciones. Si todavía se encuentran péptidos de caseína en los contenidos intestinales, se les quita por medio de filtros moleculares o por filtración sobre geles, pues se considera que las proteínas endógenas se encuentran en forma intacta al extremo del ileon (Moughan et al., 1990; Butts et al., 1991, 1992, 1993). No se puede utilizar una mezcla de AA libres porque no estimula las secreciones.

Sin embargo, Leterme et al., (1996) demostraron, por filtración sobre geles, que la fracción endógena sí contiene altas cantidades de AA libres y de oligopéptidos. Eso significa que la técnica no permite discriminar entre los componentes alimenticios y endógenos. A nivel proteico, la propuesta de Moughan tiene poco interés, tanto más cuanto que la proteína debe ser considerada como un factor que influye sobre las pérdidas específicas del alimento y no como factor corrector para medir las pérdidas basales.

Método por regresión

El método por regresión consiste en la medida del flujo ileal de nitrógeno o de AA en cerdos que reciben regímenes con un nivel de proteínas decreciente, y en la

extrapolación del flujo por una ingestión nula en proteínas. Este valor corresponde al flujo endógeno. La disminución de la cantidad de proteínas corresponde a la disminución del porcentaje de incorporación de la materia prima a estudiar, en una dieta que va a contener cantidades crecientes de nutrientes no nitrogenados (almidón, azúcar, aceite).

La supuesta ventaja de la técnica es que el animal recibe un alimento proteico y tiene un estado fisiológico normal y que se toma en cuenta el efecto de los factores alimenticios sobre las pérdidas. Eso no es cierto, porque el efecto de los dichos factores disminuye con la tasa de incorporación de la materia prima en la dieta. Además, la precisión dependerá del número de nivel proteico y de la diferencia entre los niveles de proteínas, entre otros factores. Finalmente, los diferentes regímenes tienen una composición en fibras y otros factores distintos, de tal manera que la extrapolación permite determinar solamente el nivel basal de pérdidas endógenas. En conclusión, la técnica es más complicada que la de la dieta libre de proteínas pero no da más datos. Por estas razones no se utiliza mucho.

Método de la homoarginina

El principio del método es el de la guanidación, es decir, la transformación de la lisina de una proteína en homoarginina (HA), después de un tratamiento químico (con *o*-metilisourea) (Hagemester y Erbesdobler, 1985). La HA no se encuentra en las proteínas endógenas. Por lo tanto, toda la HA encontrada en la digesta proviene únicamente del alimento. Con eso se puede determinar la digestibilidad ileal real de la proteína alimenticia y también el flujo de lisina endógena. Si se conoce el perfil en AA de las secreciones, se puede también hacer una extrapolación del flujo de todos los AA endógenos.

La validez de esta técnica está basada en las hipótesis que la proteína guanidinada es digerida de la misma manera que la proteína no tratada, que la HA no afecta las secreciones digestivas y el metabolismo protéico, que no aparece en las secreciones y que la transformación es completa dentro del alimento (Moughan et al., 1998).

La validez de las primeras hipótesis ha sido verificada. Sin embargo, no se puede afirmar que la transformación es completa en materias primas. Al principio la técnica fue utilizada para estudiar proteínas aisladas, como la caseína y la proteína de la soya, entre otras. En este caso se puede fácilmente solubilizar la proteína en una solución alcalina y realizar la transformación. Sin embargo, con

una materia prima, no es posible llegar a la totalidad de las proteínas porque, por ejemplo, parte de ellas están encapsuladas en células cubiertas de fibras, etc. Diferentes autores como Hodgkinson y Moughan (2000) y Caine et al., (1998) afirman que la proteína está marcada con HA de manera homogénea. Sin embargo, en el trabajo de Caine, el tratamiento produjo la pérdida de 240 a 380 g de materia seca por kg de soya, por solubilización en el agua de enjuague y se transformó solamente de 30 a 46 % de lisina en HA, lo que demuestra claramente la incapacidad de la técnica para marcar las proteínas de un alimento como tal (Leterme y Séve, 1998). En conclusión, esta técnica tiene una aplicación limitada a las proteínas puras, aisladas.

Métodos directos: la dilución isotópica con ^{15}N

El principio de la técnica de dilución isotópica es el de marcar una de las dos fuentes de proteínas con ^{15}N , un isótopo estable (no radioactivo) del nitrógeno, presente naturalmente en el aire y los componentes nitrogenados (0.3663 % del N total). El isótopo está incorporado en las proteínas marcadas. Se mide la concentración del ^{15}N en el N total de los contenidos del intestino y se la compara con la concentración inicial en las proteínas marcadas. La relación entre ambos resultados permite determinar la proporción de cada fuente de nitrógeno. Dos alternativas son posibles: marcar las proteínas alimenticias o las secreciones digestivas (Figura 2).

Marcaje de las secreciones digestivas

El principio de la técnica desarrollada por W. Souffrant et al., (1982) en Rostock (Alemania) es el de perfundir un AA marcado con ^{15}N en la sangre de los cerdos. El AA se incorporará en todas las secreciones y los tejidos del animal. Cuando se alcanza un equilibrio de marcación, se mide la concentración en ^{15}N de las secreciones y de los contenidos digestivos. La razón da la proporción de nitrógeno endógeno en el nitrógeno total de los contenidos. Si se conoce el flujo de N total a nivel ileal, se puede determinar el flujo de N endógeno y, luego, la digestibilidad ileal real del N del alimento.

Como no es posible aislar las secreciones digestivas, se utiliza, como referencia de marcaje de las secreciones, la concentración en ^{15}N de los AA libres de la sangre, considerados como el pool precursor de la síntesis de las secreciones.

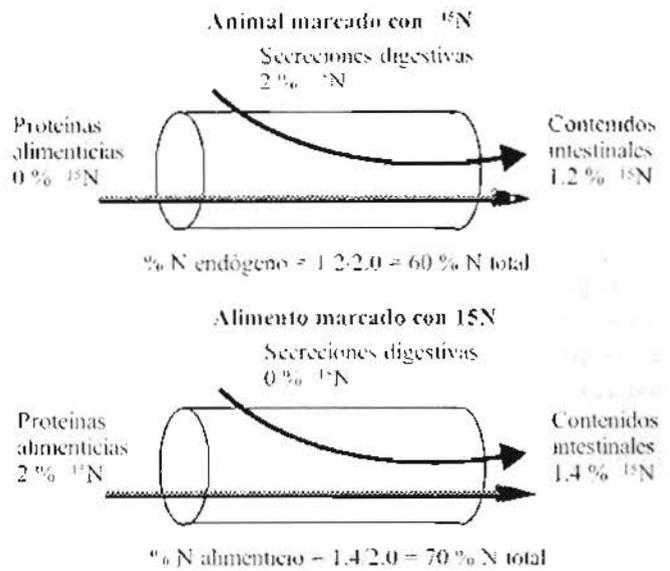


Figura 2 Principio de la técnica de dilución isotópica con ^{15}N

Siempre se utiliza la leucina como fuente de ^{15}N porque es el AA menos costoso, es poco catabolizado en el hígado, es decir más disponible para las síntesis, y cambia fácilmente su radical $-\text{NH}_2$ con otros AA (transaminación), en particular la isoleucina y la valina y todos los AA no esenciales, lo que aumenta la representatividad del marcador en los AA (De Lange et al., 1990; Leterme y Séve, 1998; Hess et al., 1998).

En la práctica, se debe proveer diariamente al animal con 10 a 40 mg ^{15}N -leucina (95%)/kg $\text{P}^{0.75}$, por perfusión intravenosa, esperar ocho días a que se alcance un equilibrio de marcaje (steady-state o estado estacionario) de las secreciones y tomar diariamente muestras de sangre. Los AA libres de la sangre se aíslan después de la precipitación de las proteínas del plasma con ácido tricloroacético y de una centrifugación. El análisis del ^{15}N se realiza por espectrometría de masa.

La ventaja de la técnica es que se pueden determinar las pérdidas endógenas causadas por cualquier materia prima. Sin embargo, la técnica permite trabajar solamente a nivel del nitrógeno total y no de los AA, incluidos los AA marcados (Leterme y Séve, 1998). Además, se demostró que los AA libres de la sangre no son la única fuente para la síntesis de proteínas digestivas y que, por eso, no constituyen un buen testigo de la marcación de las secreciones (Leterme et al., 1993; Leterme y Séve, 1998). Finalmente, se desconoce la validez de representatividad de la leucina frente a los otros AA.

- growing pigs. 2. Blood variables and mineral balances. *Br. J. Nutr.* 68 : 305-315.
- Laplace J. P. 1971. Le transit digestif chez les monogastriques. I. Les techniques d'étude. *Ann. Zootech.* 21 : 83-105.
- Laplace J. P., Darcy-Vrillon B., Picard M. 1985. Evolution de la disponibilité des acides aminés: choix raisonné d'une méthode. *J. Rech. Porcine France* 17 : 353-370.
- Leterme P., Théwis A., Beckers Y., Baudart E. 1990. Apparent and true ileal digestibility of amino acids and nitrogen balance measured in pigs with ileo-rectal anastomosis or T-cannulas, given a diet containing peas. *J. Sci. Food Agric.* 52 : 485-497.
- Leterme P., Théwis A., Genot L., François E., Wathelet B. 1993. Determination of the true ileal digestibility of amino acids in pigs by means of ^{15}N -labelled diets. In : Verstegen M., den Hartog L., van Kempen G., Metz J. (Eds) Nitrogen flow in pig production and environmental consequences. EAAP Publ. 69 : Pudoc Scientific Publ., Wageningen, the Netherlands, pp 49-54.
- Leterme P. 1995. Estimation de la digestibilité iléale réelle des acides aminés chez le porc: étude méthodologique et proposition d'une technique utilisant des protéines végétales enrichies en ^{15}N . Ph. D thesis. Faculté des Sciences agronomiques, Gembloux, Belgique, 244 p.
- Leterme P., Théwis A., François E., P. van Leeuwen, B. Wathelet, J. Huisman 1996. The use of ^{15}N -labeled dietary proteins for determining true ileal amino acid digestibilities is limited by their rapid recycling in the endogenous secretions of pigs. *J. Nutr.* 126 : 2188-2199.
- Leterme P., Sève B. 1998. Trypsin inhibitors and endogenous amino acids. *J. Nutr.* 128 : 2526-2527.
- Leterme P., Froidmont E., Rossi F., Théwis, A. 1998a. The high water-holding capacity of pea inner fibres affects the ileal flow of endogenous amino acids in pigs. *J. Agric. Food Chem.* 46 : 1927-1934.
- Leterme P., Sève B., Théwis A. 1998b. The current ^{15}N -leucine infusion technique is not suitable for quantitative measurements of ileal endogenous amino acid flows in pigs. *J. Nutr.* 128 : 1961-1968.
- Leterme P. 2001. Las pérdidas endógenas al ileón del cerdo. I. Origen y factores de variación. *Acta Agronomica* (en prensa).
- Lien K., Sauer W., Mosenthin R., Souffrant W., Dugan M. 1997a. Evaluation of the ^{15}N -isotope dilution technique for determining the recovery of endogenous protein in ileal digestion of pigs: effect of dilution in the precursor pool for endogenous nitrogen secretion. *J. Anim. Sci.* 75. 148-158.
- Lien K., Sauer W., Dugan M. 1997b. Evaluation of the ^{15}N -isotope dilution technique for determining the recovery of endogenous protein in ileal digestion of pigs: effect of pattern of blood sampling, precursor pools and isotope dilution technique. *J. Anim. Sci.* 75 : 159-169.
- Low A. 1977. Digestibility at several intestinal sites in pigs. *Proc. Nutr. Soc.* 36, 189-194.
- Moughan P., Darragh A., Smith W., Butts C. 1990. Perchloric and trichloroacetic acids as precipitants of protein in endogenous ileal digesta from the rat. *J. Sci. Food Agric.* 52. 13-21.
- Pond W., Pond K., Ellis W., Matis J. 1986. Markers for estimating digesta flow in pigs and the effects of dietary fiber. *J. Anim. Sci.* 63: 1140-1149.
- Sauer W., Just A., Jörgensen H. 1982. The effect of feed intake on ileal and fecal availabilities in pigs. *Z. Tierphysiol. Tierernährg. u. Futtermittelkde* 48. 177-184.
- Sauer W., de Lange K. 1992. Novel methods for determining protein and amino acid digestibilities in feedstuffs. In: Nissen S. (Ed) Modern methods in protein nutrition and metabolism. Academic Press Publ., pp 87-120.
- Sauer W., Fan M., Mosenthin R., Drochner W. 2000. Methods for measuring ileal amino acid digestibility in pigs. In : D'Mello J.P. (Ed) Farm animal metabolism and nutrition. CABI Publ., Wallingford UK, pp 279-306.
- Schröder H., Schulz E., Oslage H. 1989. Einfluss unterschiedlicher Kanülentechniken -Fensterkanüle vs Umleitungskanüle- auf die praecaecal genessene Verdaulichkeit von N-Verbindungen. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 61. 169-178.
- Sève B., Leterme P. 1997. Amino acid fluxes in the pig. In: Laplace J.P., Février C., Barbeau C. (Eds) Proc. 7th Int. Symposium on the Digestive Physiology in the Pig. St Malo (Fr), pp 304-315.
- Souffrant W., Köhler R., Gebhardt G. 1982. Détermination de l'azote endogène dans les contenus digestifs par la technique isotopique (^{15}N). In: J. Laplace, T. Corring, A. Rérat (Eds) Physiologie digestive chez le porc. Colloques INRA 12, 175-187.
- van Leeuwen P., van Kleef D., van Kempen G., Huisman J., Verstegen M. 1991. The post-valve T-caecum cannulation technique: an alternative method for chyme collection in pigs. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 65. 183-193.
- Yin Y., Hunan R., Zhong H., Chen C., Dai H. 1991. Influence of different cannulation techniques on the pre-caecal digestibility of protein, amino acids and cell wall constituents from diets, containing different protein meals, in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 35, 271-281.
- Zebrowska T. 1973. Digestion and absorption of nitrogenous compounds in the large intestine of pigs. *Rocz. nauk Roln.* B95 (3), 85-90.