



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Transport i metabolisme de l'hidroxianàleg de la metionina a l'intestí de pollastre i en cèl·lules Caco-2

Raquel Martín Venegas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Farmàcia

Departament de Fisiologia (Farmàcia)

Programa de Doctorat: Medicaments, Alimentació i Salut

(2001-2003)

Transport i metabolisme de l'hidroxianàleg de la metionina a l'intestí de pollastre i en cèl·lules Caco-2

Memòria presentada per Raquel Martín Venegas per optar al títol de Doctor per la
Universitat de Barcelona

Signatura de la Directora:

Dra. Ruth Ferrer Roig

Signatura de la doctoranda:

Raquel Martín Venegas

Raquel Martín Venegas

2006



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Fisiologia (Farmàcia)

Facultat de Farmàcia
Edifici B, escala A, 3a planta
Av. Joan XXIII, s/n
08028 Barcelona
Tel. 93 402 45 05
Fax 93 403 59 01

Ruth Ferrer Roig, Professora Titular de Fisiologia del Departament de Fisiologia (Farmàcia)
de la Universitat de Barcelona,

INFORMA:

Que la memòria titulada *Transport i metabolisme de l'hidroxianàleg de la metionina a l'intestí de pollastre i en cèl·lules Caco-2* presentada per RAQUEL MARTÍN VENEGAS per optar al Grau de Doctor per la Universitat de Barcelona, ha estat realitzada sota la meua direcció al Departament de Fisiologia (Farmàcia), i considerant-la conclusa, autoritzo la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I, per què així consti, signo la present a Barcelona, el dia 16 de maig de 2006.

Dra. Ruth Ferrer Roig

Aquesta tesi ha estat subvencionada pels projectes FBG-3891, FBG-302640 i FBG-303388 de la *Fundació Bosch i Gimpera* i *Adisseo France SAS* i pels ajuts 2001-SGR-0142 i 2005-SGR-0632 de la *Generalitat de Catalunya*. Durant la seva realització, l'autora ha gaudit d'un *Ajut per a la realització de la tesi doctoral* (2001-2002) i d'una *Beca de Formació en la Recerca i la Docència* de la Universitat de Barcelona (2002-2006).

AGRAÏMENTS

Tinc la sort de gaudir d'una família i d'uns amics i companys meravellosos. A tots, senzillament gràcies, us estimo molt !!

A la Dra. Ruth Ferrer, afectuosament la Rut, per animar-me a formar part d'aquest projecte i per formar-me en el món de la Fisiologia. Hem viscut grans moments professionals i personals, amb "dificultats" i amb èxits... i tots ells han fet que hagi estat molt més que una directora. Ha estat un veritable plaer treballar amb tu, de debò.

A la Maria José, la meva petita, perquè des del primer dia que et vaig conèixer ja va néixer entre nosaltres una complicitat i una confiança que ens han portat a una amistat molt i molt especial. Amb el cor a la mà, només puc dir-te GRÀCIES. A més, formem un bon equip, no creus?

A la Montse Mitjans, per l'energia que desprens i per tenir un cor tan i tan gran. Només arribar al departament ja vam "connectar" i des de llavors, sempre has estat al meu costat. Moltes gràcies... Fins i tot has fet que m'agradi el succedani de cafè del bar !!

A la Sònia Roig, per fer-me saber que sempre puc comptar amb tu.

A Maria Vicario, por tu constante ánimo y cariño. Te quiero un montón, preciosa !!

A Thais, por tu carácter estimulador y emprendedor. Me encanta tenerte cerca aunque estés un poco lejos.

Al Francisco Pérez, perquè ets una de les persones més maques que conec, pel teu bon caràcter i perquè sempre et preocupes de tot i de tothom.

Al Manel Rabanal (Manelin) per fer-me riure de veritat i per deixar que em desfogués de tant en tant.

A Silvia, por tu especial sentido del humor que me ha ayudado a liberar tensiones y por ser una muy buena amiga.

A l'Emma, per ser tan bona personeta i pel teu esperit lluitador. *A Ana González, por tu sonrisa y por ser tan dulce. A Carolina, por ser un amor y por esa vitalidad. A Sara y Teresa, por ese "buen rollo" que os acompaña.* A la Marta i al Jaume, per la vostra simpatia.

A la Diana, la Vero, la Lourdes, la Vanessa i l'Esther pel vostre optimisme contagiós i senzillament perquè sou genials !! Molts ànims amb la Tesi, cada cop esteu molt més a prop !! *Gracias Vanessa por aguantarnos a todas en esta recta final y mucha suerte con tu Tesis !!*

A la Laia González, per ser tan agradable i per donar-me ànims en tot moment. Al Carles per estar sempre disposat a ajudar-me. Al Noé Garín, per la teva implicació i afecte. A l'Elvira, el Tomàs, la Celia, el Jaume, la Rebeca,... i tots aquells que ja fa temps que no ens veiem però que us recordo i us anyoro.

A la Vanessa Alba, l'Àngels Moscatel i la Pilar Serrat per estar sempre disposades a fer-nos la vida més fàcil sense perdre mai el somriure i per aquest bon humor que tant m'agrada.

A la Pilar Vinardell, per fer-me sempre un lloc i per aquesta empenta que s'encomana. A la Cristina Castellote, la Margarida Castell i especialment a l'Àngels Franch, per la vostra disponibilitat i bon fer. *A Juan José Moreno, por esa visión "diferencial" de las cosas que, a veces, viene tan bien.* A la Carme Pelegrí i al Jordi Vilaplana, pel vostre bon tarannà. A la Trinitat Cambras, per aquest somriure que s'encomana i per estar sempre disposada a resoldre'm qualsevol dubte. Al Toni Diez, pel teu assessorament estadístic i matemàtic. Al Pep Queralt, per la teva simpatia.

A tot el personal de l'ULD i molt especialment a la Lúcia. També a la Josefina Prat, per la valuosa ajuda que m'has ofert en tot moment i pel teu afecte.

Al personal dels Serveis Científicotècnics per l'excel·lent professionalitat de tots ells i molt especialment a la Teresa, *por ser tan buena amiga*, a la Maria Reixac, l'Isidre Casals, la Pilar Fernández i l'Anna Belén. Amb tots vosaltres he tingut una excel·lent relació laboral i personal.

També a la Unitat de Química Combinatòria pels mitjans que han posat a la meua disposició i molt especialment a la Sònia Varón, pels mil consells i per tota l'ajuda desinteressada que m'has donat. Gràcies també a l'Agustí Munté i al Xavier Cañas pel vostre assessorament en tot moment.

Al Andrés Jiménez, por tu interés y amabilidad, y por ayudarme con el traslado del producto radioactivo.

Al Dr. Enric Esteve, pels teus consells i aportacions tan valuoses.

A la Secretaria d'Estudiants i Docència de la Facultat de Farmàcia, i especialment a l'Àngels Barceló per la seva paciència.

A la *Librería Estudio* i especialment a l'Alejandro, per donar forma definitiva a aquest batibull.

To Adisseo for the financial support and especially to Dr. Pierre-André Geraert for your valuable scientific collaboration and for giving me the opportunity to carry out my Doctoral Thesis. Thank you very much.

A tots els meus amics i especialment a la Sandra, l'Àngel, el Jordi F, el Jordi L, el Joan i a les "novingudes" M^a Àngels i Judit. També a la Inés i la Cristina. Sou tots molt important per mi. Gràcies per donar-me ànims sempre que els necessitava. M'heu recolzat moltíssim, de debò.

A mis padres, por estar siempre de mi lado y tan cerca, incondicionalmente. Al resto de la "family" por vuestro apoyo y por entenderme aún sin entender muy bien lo que hago. Gracias, os quiero mucho a todos.

"La recompensa es troba en l'esforç. Un esforç total és una victòria completa"

Mahatma GANDHI

A en Sergi, per estar al meu costat, per estimar-me, per caminar junts, per ajudar-me a continuar endavant, i per tantes i tantes coses: ets el meu motor. T'estimo "tinyet"

ÍNDEX	I
ÍNDEX DE FIGURES	VII
ÍNDEX DE TAULES	XI
LLISTA D'ABREVIATURES	XIII
 1. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS	 3
 2. INTRODUCCIÓ	 9
2.1. Estructura de l'epiteli intestinal	9
2.2. Absorció intestinal de nutrients	12
2.2.1. Via paracel·lular	12
2.2.2. Via transcel·lular	12
2.3. Proteïnes i aminoàcids de la dieta	14
2.4. Requeriment d'aminoàcids soferts en les dietes per a pollastres	16
2.5. Suplements de Met en pinsos de pollastre	17
2.6. Absorció intestinal de les diferents fonts de Met	18
2.6.1. Transport de DL-Met	18
2.6.2. Transport de DL-HMB	20
2.7. Cultius de cèl·lules Caco-2 com a model per a l'estudi de l'absorció intestinal	22
2.8. Metabolisme de les diferents fonts de Met	23
2.8.1. Conversió de D-Met i DL-HMB en L-Met	23
2.8.2. Metabolisme de la L-Met	24
2.8.3. Metabolisme de la L-Cys	26
2.9. Funcions de la L-Met i dels seus metabòlits	27

2.10. Dèficit i toxicitat de la Met	28
2.11. Treballs comparatius entre DL-HMB i DL-Met	30
3. MATERIAL I MÈTODES	35
3.1. Estudis a l'intestí de pollastre	35
3.1.1. Materials	35
3.1.2. Animals d'experimentació	35
3.1.3. Fonts de Met utilitzades en les dietes experimentals	35
3.1.4. Composició de les dietes experimentals	36
3.1.5. Tècnica dels sacs evertits	38
3.1.6. Quantificació del monòmer del DL-HMB-PCM i del DL-HMB per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)	41
3.1.7. Hidròlisi alcalina dels oligòmers del DL-HMB	43
3.1.8. Quantificació de Met, Cys, Tau i altres aminoàcids per cromatografia de bescanvi iònic	44
3.1.9. Anàlisi estadística	45
3.2. Estudis en cèl·lules intestinals Caco-2	45
3.2.1. Materials	45
3.2.2. Cultiu cel·lular	46
3.2.3. Composició dels medis de cultiu	46
3.2.4. Tripsinització	47
3.2.5. Recompte de cèl·lules viables	47
3.2.6. Ressembla del cultiu	48
3.2.7. Determinació de l'activitat sacarasa	49
3.2.8. Determinació de la concentració de proteïnes	51
3.2.9. Composició dels medis de Krebs	52
3.2.10. Avaluació de la permeabilitat paracel·lular	53

3.2.10.1. Resistència elèctrica transepitelial (TEER).....	53
3.2.10.2. Fluxos unidireccionals de D-mannitol	54
3.2.11. Transport a través de la membrana apical	55
3.2.12. Cinètica del transport	56
3.2.12.1. Anàlisi cinètica del transport apical	56
3.2.12.2. Cinètica de Dixon	56
3.2.13. Purificació del DL-HMB radioactiu	58
3.2.14. Incorporació de la radioactivitat a les proteïnes	59
3.2.15. Determinació del pH intracel·lular (pH _i)	60
3.2.16. Determinació de l'activitat D-HADH	61
3.2.17. Anàlisi estadística	62
4. RESULTATS	65
4.1. Estudis a l'intestí de pollastre	65
4.1.1. Pes dels animals	65
4.1.2. Establiment de les condicions analítiques	65
4.1.3. Concentració de monòmer en el medi mucosal	66
4.1.4. Hidròlisi intestinal de les formes no-monomèriques del DL-HMB	68
4.1.5. Acumulació de monòmer en la paret intestinal	68
4.1.6. Aparició de monòmer en el medi serosal	70
4.1.7. Aparició de Met en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB	72
4.1.8. Aparició de Cys en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB i L-Met	73
4.1.9. Aparició de Tau en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB i L-Met	73

4.1.10. Aparició d'aminoàcids no-sofrats en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB i L-Met	74
4.2. Estudis en cèl·lules intestinals Caco-2	75
4.2.1. Permeabilitat paracel·lular i concentració de proteïnes	75
4.2.2. Efecte del gradient de H^+ i de Na^+ en el transport apical de DL-HMB	76
4.2.3. Inhibició <i>cis</i> del transport apical de DL-HMB en presència d'un gradient de H^+	79
4.2.4. Transport apical de DL-HMB en absència d'un gradient de H^+	80
4.2.5. Constants cinètiques del transport apical de DL-HMB	81
4.2.6. Transport apical de DL-HMB en presència de L- o D-Met	83
4.2.7. Transport apical de L- i D-Met en presència de DL-HMB	83
4.2.8. Caracterització del mecanisme responsable de la interacció del DL-HMB amb el transport apical de L-Met	85
4.2.9. Caracterització cinètica de la interacció del DL-HMB amb el transport apical de L-Met	88
4.2.10. Viabilitat cel·lular dels cultius mantinguts en plaques amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met	89
4.2.11. Permeabilitat paracel·lular dels cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met	94
4.2.12. Concentració de proteïnes dels cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met	95
4.2.13. Transport apical de DL-HMB en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met	95
4.2.14. Transport apical de DL-Met en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met	97

4.2.15. Incorporació de la radioactivitat procedent del DL-HMB o de la DL-Met a les proteïnes cel·lulars al llarg del temps d'incubació	97
4.2.16. Incorporació de la radioactivitat procedent del DL-HMB o de la DL-Met a les proteïnes cel·lulars en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met	99
4.2.17. Activitat D-HADH en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB	100
5. DISCUSSIÓ	103
6. CONCLUSIONS	121
7. BIBLIOGRAFIA	127

ANNEX 1

- Oligomers are not the limiting factor in the absorption of DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid in the chicken small intestine (2006). *Poult Sci* 85:56-63.

ANNEX 2

- Conversion of the methionine hydroxy analogue, DL-2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid, to sulfur-containing amino acids in the chicken small intestine (2006). *Poult Sci*, en premsa.

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.	Estructura de la paret intestinal	9
Figura 2.	Representació d'una vellositat intestinal	11
Figura 3.	Esquema de la via paracel·lular i transcel·lular	12
Figura 4.	Esquema de la difusió simple	13
Figura 5.	Esquema del transport mediat equilibratiu o difusió facilitada	14
Figura 6.	Esquema del transport mediat concentratiu o transport actiu	14
Figura 7.	Estructura química de la DL-Met i del DL-HMB	17
Figura 8.	Imatge de la vora en raspall de cèl·lules Caco-2	22
Figura 9.	Esquema del metabolisme de les diferents fonts de Met	25
Figura 10.	Anatomia del sistema digestiu del pollastre	38
Figura 11.	Esquema de l'emplenament d'un sac intestinal evertit	39
Figura 12.	Disseny experimental per al càlcul de la hidròlisi intestinal dels oligòmers ...	43
Figura 13.	Esquema del cultiu en flascons	48
Figura 14.	Esquema del cultiu en plaques	49
Figura 15.	Esquema del cultiu en filtres	49
Figura 16.	Esquema de la determinació de l'activitat sacarasa	50
Figura 17.	Esquema de la determinació de la TEER	54
Figura 18.	Esquema de la determinació dels fluxos unidireccionals de D-mannitol	55
Figura 19.	Esquema de la determinació del transport a través de la membrana apical ..	55
Figura 20.	Representació de Dixon en una inhibició competitiva	57
Figura 21.	Representació de Dixon en una inhibició no-competitiva	57
Figura 22.	Representació de Dixon en una inhibició acompetitiva	58
Figura 23.	Cromatograma corresponent al DL-HMB radioactiu comercial	59
Figura 24.	Relació lineal entre el pH _i i la fluorescència a 485/440 nm	61
Figura 25.	Reacció enzimàtica en la determinació de l'activitat D-HADH	62

Figura 26. Exemple dels canvis de l'absorbància al llarg del temps en la determinació de l'activitat D-HADH	62
Figura 27. Pes dels animals el dia del sacrifici	65
Figura 28. Cromatograma corresponent al DL-HMB-PCM i DL-HMB	66
Figura 29. Concentració de monòmer en el medi mucosal de sacs evertits incubats amb DL-HMB-PCM i DL-HMB	67
Figura 30. Acumulació de monòmer en la paret intestinal de sacs evertits incubats amb DL-HMB-PCM i DL-HMB	69
Figura 31. Aparició de monòmer en el medi serosal de sacs evertits incubats amb DL-HMB-PCM i DL-HMB	71
Figura 32. Aparició de Met en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB...	72
Figura 33. Aparició de Cys en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB i L-Met	73
Figura 34. Aparició de Tau en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB i L-Met	74
Figura 35. Efecte del gradient de H^+ i de Na^+ en el transport apical de DL-HMB	76
Figura 36. Transport apical de DL-HMB durant 1 min d'incubació	78
Figura 37. Registre del pH_i després de la incubació amb DL-HMB	78
Figura 38. Inhibició <i>cis</i> del transport apical de DL-HMB en presència d'un gradient de H^+	80
Figura 39. Transport apical de DL-HMB en absència d'un gradient de H^+	81
Figura 40. Transport apical de concentracions creixents de DL-HMB	82
Figura 41. Cinètica de Dixon del transport apical de L-lactat en presència de DL-HMB	82
Figura 42. Transport apical de DL-HMB en presència de L- o D-Met	83
Figura 43. Transport apical de L- i D-Met en presència de DL-HMB i de Na^+	84
Figura 44. Transport apical de L- i D-Met en presència de DL-HMB i en absència de Na^+	85

Figura 45. Transport apical de L-Met en presència de L-lactat i CHC	86
Figura 46. Transport apical de L-Met en presència de D-prolina i betaïna	86
Figura 47. Transport apical de L-Met en presència de L-lisina i BCH	87
Figura 48. Transport apical de Tau en presència de DL-HMB i BCH	88
Figura 49. Cinètica de Dixon del transport apical de L-Met en presència de DL-HMB	88
Figura 50. Viabilitat cel·lular dels cultius mantinguts amb 0,2 mmol/L DL-HMB i DL-Met	90
Figura 51. Viabilitat cel·lular dels cultius mantinguts amb 0,02 mmol/L DL-HMB i DL-Met	91
Figura 52. Viabilitat cel·lular dels cultius mantinguts amb 2 - 5 i 10 mmol/L DL-HMB i DL-Met	92
Figura 53. Permeabilitat paracel·lular dels cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB i DL-Met	94
Figura 54. Transport apical de DL-HMB en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB i DL-Met	96
Figura 55. Transport apical de concentracions creixents de DL-HMB en cultius mantinguts amb 2 mmol/L DL-HMB	96
Figura 56. Transport apical de DL-Met en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB i DL-Met	97
Figura 57. Activitat D-HADH en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB	100
Figura 58. Cooperació funcional del transport dependent de H^+ i l'NHE3	106

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1.	Requeriments d'aminoàcids sofrats	17
Taula 2.	Sistemes de transport intestinals descrits per la Met	20
Taula 3.	Composició del DL-HMB-PCM i DL-HMB	36
Taula 4.	Ingredients i composició en nutrients de les dietes experimentals	37
Taula 5.	Composició dels medis experimentals que contenen Na ⁺	40
Taula 6.	Composició dels medis experimentals sense Na ⁺	41
Taula 7.	Composició dels reactius utilitzats en la determinació de l'activitat sacarasa	50
Taula 8.	Composició dels medis de Krebs que contenen Na ⁺	52
Taula 9.	Composició dels medis de Krebs sense Na ⁺	53
Taula 10.	Concentració de monòmer, dímer i trímer en una solució de DL-HMB-PCM i DL-HMB	67
Taula 11.	Hidròlisi intestinal dels dímers del DL-HMB	68
Taula 12.	Acumulació de monòmer en la paret intestinal en absència de Na ⁺	70
Taula 13.	Aparició de monòmer en el medi serosal en absència de Na ⁺	71
Taula 14.	Aparició d'aminoàcids no-sofrats en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB i L-Met	75
Taula 15.	Efecte de l'FCCP i de l'EIPA en el transport de DL-HMB	77
Taula 16.	Inhibició <i>cis</i> del transport de DL-HMB en presència d'un gradient de H ⁺ amb substrats de PAT1 i PepT1	79
Taula 17.	Activitat sacarasa dels cultius mantinguts amb 0,2 mmol/L DL- HMB o DL-Met	90
Taula 18.	Nombre de cèl·lules viables i quantitat de proteïna en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB i DL-Met	93

Taula 19.	Concentració de proteïnes dels cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB i DL-Met	95
Taula 20.	Percentatge de radioactivitat incorporada a les proteïnes al llarg del temps d'incubació	99
Taula 21.	Percentatge de radioactivitat incorporada a les proteïnes en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB i DL-Met	99

LLISTA D'ABREVIATURES

BBMV	vesícules de membrana de la vora en raspall
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceïna
BCH	àcid 2-aminobiciclo(2.2.1)-heptà-2-carboxílic
BSA	albúmina sèrica bovina
CHC	àcid α -ciano-4-hidroxycinnàmic
ChoCl	clorur de colina
Cys	cisteïna
D-AAOX	D-aminoàcid oxidasa
DCIP	2,6-diclorofenolindofenol
D-HADH	D-2-hidroxiàcid deshidrogenasa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
D-PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dpm	desintegracions per minut
EIPA	<i>N</i> -etil- <i>N</i> -isopropilamilorida
FCCP	p-trifluorofenilhidrazonacarbonilcianamida
GSH	glutatió
GSSG	glutatió, forma oxidada
HMB	àcid 2-hidroxi-4-metiltiolbutanoic
HMB-PCM	HMB que només conté monòmer
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució
K_d	constant de difusió
K_m	constant de Michaelis
KMB	2-keto-4-metiltiobutirat
L-HAOX	L-2-hidroxiàcid oxidasa
MCT1	<i>Monocarboxylate Transporter 1</i>

MES	àcid 4-(morfolino)età-2-sulfònic
Met	metionina
NHE3	bescanviador de Na^+/H^+ de la membrana apical
PAT1	<i>Proton Amino acid Transporter 1</i>
PepT1	<i>Peptide Transporter 1</i>
pH_a i pH_b	pH apical i pH basolateral, respectivament
pH_i	pH intracel·lular
pH_m i pH_s	pH mucosal i pH serosal, respectivament
SAH	S-adenosilhomocisteïna
SAM	S-adenosil-L-metionina
Tau	taurina
TCA	àcid tricloroacètic
TEER	<i>Transepithelial Electrical Resistance</i>
V_{max}	velocitat màxima de transport

1. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS



Les dietes comercials d'origen vegetal per animals de granja són deficitàries en un o més aminoàcids essencials, és a dir, no tots es troben en quantitat suficient per assolir els requeriments de l'animal. En aquest sentit, la metionina (Met) és limitant en dietes que contenen, com a ingredients principals, cereals i farina de llavor de soia (Nutrient Requirements of Poultry, 1994). Per tal de resoldre aquesta deficiència, la indústria agroalimentària ha desenvolupat suplementes dietètics d'aquest aminoàcid i així optimitzar l'estat nutricional i de salut dels animals i, per tant, la seva productivitat. Les principals fonts comercials de Met disponibles són la DL-Met i el seu corresponent hidroxianàleg, l'àcid DL-2-hidroxi-4-metilbutanoic (DL-HMB). Atesa la importància econòmica que comporta la cria d'animals de granja destinats a la producció de carn o d'ous, s'han portat a terme en les darreres dècades, una àmplia varietat d'estudis per tal de determinar si el DL-HMB pot substituir l'aminoàcid, especialment en aus, on aquestes dues fonts s'utilitzen extensivament.

Els treballs realitzats per determinar l'eficàcia biològica del DL-HMB en comparació amb la DL-Met han permès aprofundir en el coneixement de l'absorció, metabolisme i excreció d'aquests dos nutrients. Els resultats obtinguts, però, encara no han resolt el debat obert sobre els requeriments i la utilització de les diferents fonts de Met i plantegen diverses hipòtesis per poder explicar les diferències observades. El present treball es centra en l'intestí com a òrgan responsable de l'absorció i del metabolisme de primer pas de nutrients. L'avenç en el coneixement de l'absorció i metabolisme d'aquestes fonts de Met a nivell intestinal és de particular importància ja que la biodisponibilitat d'una substància es defineix com la fracció que arriba a circulació sistèmica. Per tal d'estudiar, doncs, la contribució de l'intestí en la utilització del DL-HMB, s'han desenvolupat els objectius que tot seguit es descriuen:

I. Determinar si el contingut en formes no-monomèriques és un factor limitant en l'absorció del DL-HMB a l'intestí prim de pollastre

En la seva presentació líquida, el DL-HMB està constituït per un equilibri dinàmic de formes monomèriques i no-monomèriques (Koban i Kobenstein, 1984; Laswon i Ivey, 1986). Les formes no-monomèriques no són absorbides per l'intestí de pollastre (Saunderson, 1991; Van Weerden *et al.*, 1992) essent per tant necessària la seva hidròlisi per poder travessar l'epiteli intestinal. Una de les hipòtesis plantejades per explicar la menor bioeficàcia del DL-HMB és, doncs, que la presència de les formes no-monomèriques

comportaria una menor concentració luminal de monòmer i, per tant, una reducció en l'absorció. Per aquesta raó, el primer objectiu d'aquest treball ha estat determinar si el contingut en formes no-monomèriques és un factor limitant en l'absorció intestinal del DL-HMB. Per tal d'assolir-lo, s'ha estudiat el transport de DL-HMB en sacs evertits de duodè, jejú i ili de pollastre i s'ha comparat amb el transport d'un producte que només conté monòmer (DL-HMB-PCM). A més, per tal d'avaluar la capacitat de la mucosa intestinal per hidrolitzar les formes no-monomèriques en el procés d'absorció, s'ha calculat aquesta variable en el mateix model experimental.

II. Avaluar la conversió del DL-HMB en L-Met i posterior metabolització a L-Cys i Tau a l'intestí prim de pollastre

La L-Met és l'única forma en què una font de Met pot ésser utilitzada en el metabolisme cel·lular o incorporada a la síntesi de proteïnes de manera que tant la D-Met com el DL-HMB han d'ésser convertits prèviament a L-Met. Així, alguns autors suggereixen que les diferències en l'eficàcia nutricional d'ambdues fonts poden estar relacionades amb aquesta conversió (Saunderson, 1985; Han *et al.*, 1990; Lemme *et al.*, 2002). Durant dècades, el fetge ha estat identificat com el principal òrgan involucrat en el metabolisme dels aminoàcids procedents de la dieta. Més recentment, però, s'ha observat que l'epiteli intestinal metabolitza una fracció considerable d'aquests aminoàcids, contribuint d'aquesta forma a la seva disponibilitat sistèmica (Brosnan, 2003; Young, 2004; Shoveller *et al.*, 2005). Per aquesta raó, el segon objectiu d'aquest treball ha estat avaluar la contribució de l'intestí en la conversió del DL-HMB en L-Met així com la seva posterior metabolització a L-Cys i Tau en sacs evertits de duodè, jejú i ili de pollastre.

III. Caracteritzar i identificar el sistema de transport del DL-HMB a la membrana apical en cèl·lules intestinals Caco-2

Els estudis referents als mecanismes implicats en l'absorció intestinal del DL-HMB reporten que l'hidroxianàleg travessa la membrana apical per difusió passiva (Dibner i Knight, 1984; Dibner *et al.*, 1988; Brachet i Puigserver, 1989) i per un mecanisme de transport no estereoespecífic, independent de Na^+ (Brachet i Puigserver, 1989) i dependent del gradient de H^+ (Maenz i Engele-Schann, 1996a; Pan *et al.*, 2002). El tercer objectiu del present treball ha estat, doncs, identificar funcionalment el sistema de transport del DL-HMB de la membrana apical en cèl·lules Caco-2 per poder determinar la seva contribució en la

biodisponibilitat del DL-HMB. A més, tenint en compte que les dietes suplementades amb DL-HMB també contenen L-Met procedent dels cereals i de la soia, s'ha estudiat si la competència d'ambdós substrats per un mateix sistema de transport podria ésser responsable de la menor eficàcia descrita per al DL-HMB. Les cèl·lules intestinals Caco-2 en cultiu formen un epitelí polaritzat amb moltes de les característiques estructurals i funcionals dels enteròcits de l'intestí prim (Hidalgo *et al.*, 1989). Aquest model experimental *in vitro* és àmpliament utilitzat avui en dia, tant per a la caracterització dels mecanismes de transport de nutrients com per a l'estudi de la seva regulació per components de la dieta (Walker *et al.*, 1998).

IV. Estudiar la regulació del transport de DL-HMB pel contingut de la dieta en DL-HMB i DL-Met en el model *in vitro* de cèl·lules Caco-2

L'absorció intestinal de nutrients varia significativament en resposta a canvis en el contingut de la dieta (Ferraris, 1994). Per aquesta raó, s'ha estudiat la regulació del transport de DL-HMB pel contingut en DL-HMB i DL-Met en el model experimental *in vitro* de cèl·lules Caco-2. El cultiu d'aquestes cèl·lules en filtres permet discriminar entre un compartiment apical i un basolateral de tal forma que es pot simular l'efecte de la dieta tot variant la composició del medi de cultiu del compartiment apical. En primer lloc, però, ha estat necessari estudiar l'efecte de les diferents fonts de Met sobre el creixement i diferenciació de les cèl·lules Caco-2.

V. Avaluar la utilització del DL-HMB a través de la seva conversió en L-Met i incorporació a proteïnes en cèl·lules Caco-2

En el procés de conversió de l'hidroxianàleg en L-Met, el D-HMB és convertit a 2-keto-4-metiltiobutirat (KMB) per l'enzim D-2-hidroxiàcid deshidrogenasa (D-HADH), localitzat en la fracció mitocondrial de diferents teixits, incloent-hi la mucosa intestinal (Knight i Dibner, 1984). Aquesta localització suggereix que el D-HMB podria ésser convertit a L-Met ja durant el procés d'absorció (Dupuis *et al.*, 1989). Així doncs, un altre objectiu ha estat determinar l'activitat de l'enzim D-HADH en cultius de cèl·lules Caco-2 mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB. A més, tenint en compte que després de la conversió, part de la L-Met disponible és incorporada a la síntesi de proteïnes, s'ha comparat la incorporació de la radioactivitat del DL-HMB i de la DL-Met a les proteïnes de les cèl·lules Caco-2.

2.1. Estructura de l'epiteli intestinal

La principal funció de l'intestí és la digestió dels aliments i l'absorció dels nutrients que en resulten, des de la llum intestinal cap a la circulació sistèmica. Així doncs, l'intestí és una estructura molt especialitzada, amb característiques morfològiques i funcionals dirigides a facilitar la seva funció d'absorció i de protecció davant tot un seguit d'agents externs potencialment nocius. La paret intestinal consta de quatre capes (**Figura 1**):

- serosa; formada per teixit connectiu recobert externament per un epiteli simple pla. De la capa serosa se n'origina el mesenteri, suport de vasos sanguinis, vasos limfàtics i fibres nervioses.
- muscular; constituïda per una capa interna de múscul en la que les fibres estan disposades circularment i una externa amb les fibres en disposició longitudinal.
- submucosa; formada per teixit connectiu que conté vasos sanguinis i limfàtics.
- mucosa; replegada formant vellositats que en el pollastre incrementen de 12 a 20 vegades la superfície d'absorció disponible (Mitjans *et al.*, 1997). Entre les vellositats hi ha les criptes de Lieberkühn on es produeixen bàsicament processos de secreció i on proliferen les cèl·lules mare de l'epiteli intestinal.

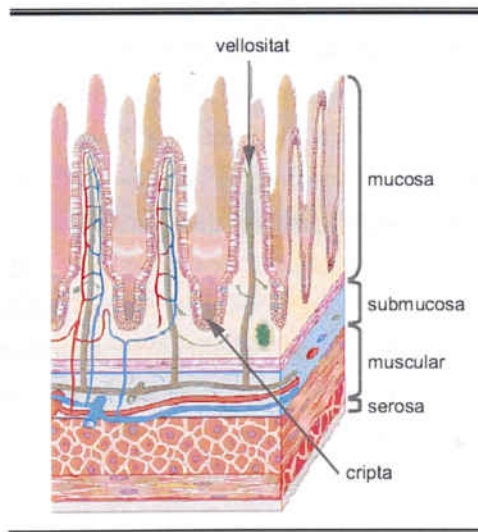


Figura 1. Estructura de la paret intestinal. Adaptació de la imatge extreta del web <http://faculty.southwest.tn.edu/jwilliams/intestine.gif>.

Al seu torn, la mucosa està constituïda per tres capes:

- ***muscularis mucosae***: capa de fibres musculars que es troba en contacte amb la submucosa i que contribueix al moviment de les vellositats.
- ***làmina pròpia***: capa de teixit connectiu que conté vasos sanguinis i limfàtics i on hi ha nombroses cèl·lules amb funcions immunològiques.
- **epiteli intestinal**: monocapa de cèl·lules epitelials en contacte directe amb la llum intestinal. Consta de diferents tipus cel·lulars distribuïts en l'eix cripta-vellositat i especialitzats en el transport vectorial de substàncies i en la funció barrera de l'epiteli:
 - cèl·lules indiferenciades: són les cèl·lules mare pluripotents que es troben en el fons de les criptes a partir de les quals se'n deriven totes les altres gràcies a la seva multiplicació i posterior diferenciació.
 - cèl·lules absorbents o enteròcits: és el tipus cel·lular majoritari de l'epiteli de les vellositats. Són cèl·lules columnars o cilíndriques altament polaritzades i amb un nucli basal (**Figura 2**). La proporció de proteïnes i fosfolípids difereix entre la membrana apical i basolateral, donant lloc a diferències en les seves activitats enzimàtiques, en la permeabilitat als nutrients i a una distribució heterogènia dels sistemes de transport. Aquesta polarització és la responsable del transport vectorial dels nutrients des de la llum intestinal a la circulació sistèmica. La membrana apical es troba en contacte amb la llum intestinal i presenta nombroses projeccions digitiformes o microvil·lis que incrementen la superfície i que constitueixen la vora en raspall (BBM; *Brush Border Membrane*). En ella, es distribueixen enzims hidrolítics com disacaridases i peptidases, implicats en processos digestius i utilitzats com a marcadors moleculars propis d'aquest tipus cel·lular. La membrana basolateral presenta l'ATPasa Na^+/K^+ , responsable de mantenir entre altres funcions el gradient electroquímic de Na^+ . Els enteròcits estan units per unions intercel·lulars (unions estretes, unions adherents, unions de comunicació i desmosomes) que aïllen el compartiment subepitelial de la llum intestinal. Les unions estretes són les responsables de la permeabilitat selectiva de l'epiteli i delimiten els dominis apical i basolateral. A més de la seva funció absorbent, els enteròcits són molt actius metabòlicament, fet que comporta una despesa energètica important. En aquest sentit, els estudis de Windmueller i Spaeth (1980) conclouen que la glutamina, el glutamat i l'aspartat són els principals substrats oxidatius de la mucosa intestinal. Cal

tenir present també que l'epiteli intestinal es renova constantment i factors com l'edat, la flora intestinal i l'estat nutricional, entre altres, poden afectar aquest procés. El dejú, per exemple, provoca una disminució de l'activitat mitòtica (Rose *et al.*, 1971), una afectació de la diferenciació cel·lular i una disminució de la taxa de migració en l'eix cripta-vellositat (Hopper *et al.*, 1972).

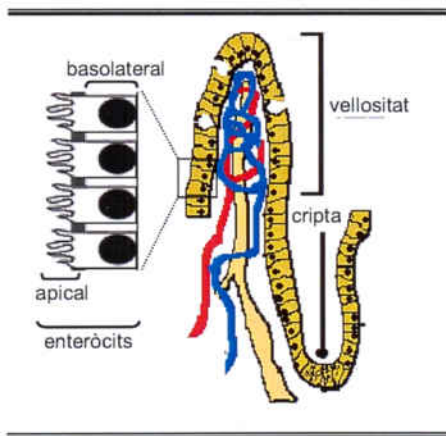


Figura 2. Representació d'una vellositat intestinal. Adaptació de la imatge extreta del web <http://z.about.com/d/biology/1/0/N/3/villus.gif>.

- cèl·lules goblet o calciformes; són cèl·lules polaritzades amb el nucli basal que es caracteritzen per la secreció de moc lubricant i protector de l'epiteli. Les propietats fisicoquímiques d'aquesta capa de moc poden modificar el procés de difusió d'una molècula, de manera que es considera una primera barrera en el procés d'absorció (Winne, 1979).
- cèl·lules de Paneth; són cèl·lules situades a les criptes que secreten principalment pèptids antimicrobians, participant així en la funció de barrera defensiva de l'epiteli.
- cèl·lules enteroendocrines; són una població heterogènia que es diferencien entre si per la morfologia dels grànuls de secreció i pels pèptids que contenen.
- cèl·lules M; recobreixen l'epiteli de fol·licles limfoides (plaques de Peyer) i tenen la capacitat de transportar antígens macromol·leculars i microorganismes des de la llum intestinal fins als fol·licles.

2.2. Absorció intestinal de nutrients

Fins fa unes dècades, es considerava que l'absorció de nutrients i d'altres substàncies es produïa només per processos de difusió passiva, sense la participació de cap procés actiu per part de la mucosa intestinal. Els avenços en la recerca han demostrat que, a més dels processos passius, també participen activament sistemes de transport específics per monosacàrids, aminoàcids, pèptids, lípids i altres substàncies. Així doncs, cal considerar que l'absorció intestinal és un procés complex que inclou diferents vies o mecanismes que es poden classificar tal i com es detalla a continuació.

2.2.1. Via paracel·lular

Es tracta de la difusió simple de soluts a través dels espais intercel·lulars de l'epiteli intestinal (**Figura 3**), de manera que són les unions estretes les que determinen la seva permeabilitat.

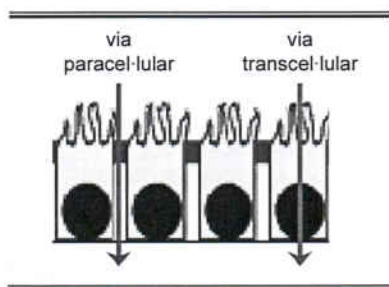


Figura 3. Esquema de la via paracel·lular i transcel·lular.

2.2.2. Via transcel·lular

És el transport vectorial que es produeix seqüencialment a través de la membrana apical i basolateral (**Figura 3**). Segons si es requereix aportació d'energia, es pot diferenciar entre:

- **Transport no-mediat.** També anomenat difusió simple. Aquest tipus de transport depèn de les propietats fisicoquímiques de la substància (com el pes molecular, la mida i la solubilitat, entre altres) i de la permeabilitat de la membrana. Aquesta via no requereix aportació d'energia, ja que es produeix a favor del gradient de concentració, i fa referència al moviment inespecífic de substrats a través de la membrana o a través de porus (**Figura 4**). La velocitat de difusió depèn, segons la llei de Fick, del gradient

electroquímic que existeix a través de la membrana i del coeficient de difusió del substrat. L'equació general que descriu el comportament cinètic de la difusió simple és la següent:

$$v = K_d \cdot [S]$$

on v és la velocitat de difusió, $[S]$ la concentració de substrat i K_d la constant de difusió, és a dir, la permeabilitat de la membrana per a un determinat substrat. El valor d'aquesta constant depèn del tipus de substrat, de la regió intestinal i de l'espècie animal estudiada.

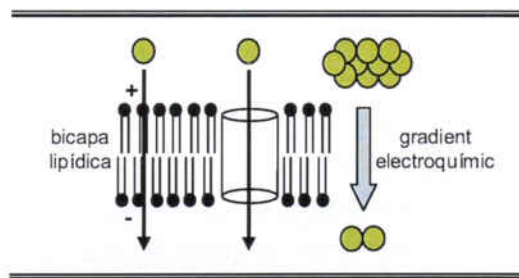


Figura 4. Esquema de la difusió simple.

- **Transport mediat.** Requereix de la participació de proteïnes transportadores que reconeixen específicament el substrat i el transloquen a l'altre costat de la membrana. La unió al transportador depèn de la concentració de substrat i de l'afinitat de la proteïna per al substrat. Aquest tipus de transport és saturable, inhibible per anàlegs estructurals i per inhibidors específics i presenta una cinètica de tipus Michaelis-Menten definida per la següent equació:

$$v = V_{\max} \cdot [S] / K_m + [S]$$

on v és la velocitat de transport, $[S]$ la concentració de substrat, $V_{\max}$ és la velocitat màxima de transport i K_m (constant de Michaelis) és la concentració de substrat a la qual la velocitat de transport és la meitat de la $V_{\max}$ i és inversament proporcional a l'afinitat que té el transportador per al substrat. Es poden distingir els següents tipus de transport mediat:

- Transport mediat equilibratiu o difusió facilitada. És un procés que no requereix consum d'energia ja que funciona a favor del gradient electroquímic (**Figura 5**).

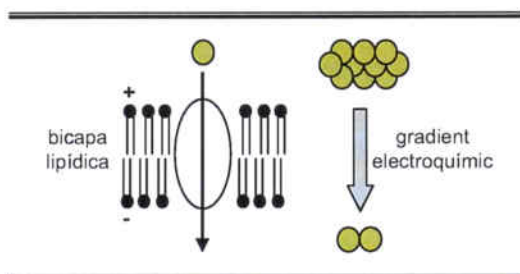


Figura 5. Esquema del transport mediat equilibratiu o difusió facilitada.

- Transport mediat concentratiu o transport actiu. És un procés que requereix consum d'energia ja que pot funcionar en contra del gradient elctroquímic (**Figura 6**). La proteïna transportadora pot moure el substrat sol (uniport), acompanyat d'un ió en un mateix sentit (simport) o en sentit oposat (bescanviador o antiport). A més, segons com sigui l'aportació d'energia, els sistemes de transport es classifiquen en primaris, secundaris o terciaris. En els primaris, l'obtenció d'energia procedent de la hidròlisi de l'ATP està directament acoblada a la proteïna transportadora. Els secundaris aconseguixen l'energia del gradient electroquímic generat per un sistema primari o secundari per a ions com el Na^+ o el H^+ . Els terciaris aprofiten l'energia que prové del gradient d'un altre substrat o ió generat per un sistema secundari.

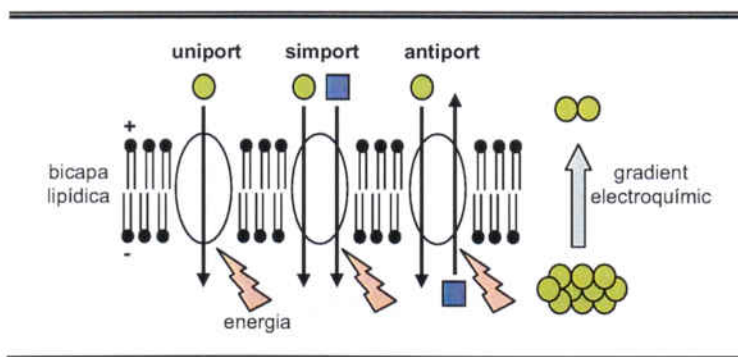


Figura 6. Esquema del transport mediat concentratiu o transport actiu.

2.3. Proteïnes i aminoàcids de la dieta

La digestió de les proteïnes de la dieta s'inicia per l'acció de diferents enzims digestius que les trenquen, formant majoritàriament pèptids. Aquests, s'hidrolitzen per l'acció de diferents proteases situades en la membrana luminal de l'epiteli intestinal, originant pèptids

de cadena curta i aminoàcids. Els aminoàcids es diferencien per les seves propietats fisicoquímiques, com solubilitat, càrrega, pes molecular i estructura. A pH fisiològic, alguns aminoàcids presenten càrrega neta positiva (aminoàcids catiónics), altres negativa (aminoàcids aniónics) i la majoria presenten una càrrega neta neutre (aminoàcids neutres, dipolars o amfòters). Pel que fa a l'estructura, poden presentar una molècula de sofre en la seva estructura (aminoàcids sofrats), configuració cíclica (aminoàcids aromàtics) o fins i tot pot tractar-se de β -aminoàcids i iminoàcids. En termes nutricionals, poden ésser:

- aminoàcids no essencials: aquells que poden ésser sintetitzats a partir d'altres aminoàcids.
- aminoàcids essencials: aquells que no poden ésser sintetitzats per l'organisme i la seva aportació procedeix majoritàriament de la dieta.

Els nivells intracel·lulars de cada aminoàcid són el resultat d'un equilibri entre l'entrada (degradació de proteïnes, aportació amb la dieta, i en alguns casos, síntesi *de novo*) i la sortida (síntesi proteica, metabolisme). Tenen múltiples funcions però, en general, cal tenir present que tots ells intervenen com a (Battezzati i Riso, 2002):

- **precursors en la síntesi de proteïnes**: els aminoàcids poden enllaçar-se gràcies a la formació d'enllaços peptídics donant lloc a pèptids i proteïnes. És una funció essencial ja que una reducció del 25% en les proteïnes totals de l'organisme comporta la mort. A més, cal tenir present que el dèficit o la limitació de tan sols un aminoàcid limita aquesta síntesi.
- **combustible**: els aminoàcids poden ésser utilitzats com a font d'energia en alguns teixits i poden aportar fins a un 15% de la despesa energètica en repòs.
- **precursors de constituents no proteics**: els aminoàcids actuen com a moduladors en processos de senyalització ja que participen per exemple en la síntesi d'hormones i neurotransmissors. A més, també intervenen en la síntesi d'algunes vitamines i endorfines, així com també són precursors en la formació de glutatió, queratina i colina, entre d'altres.

L'organisme disposa de mecanismes per mantenir un equilibri fisiològic intern o homeòstasi. Aquest equilibri és dinàmic i en el cas de les proteïnes és un equilibri entre processos de síntesi i trencament, ambdós de notable rellevància a l'intestí, fetge, pàncreas,

ronyó i plasma, encara que també són importants al múscul, cervell i a la pell. En períodes de creixement, la taxa de síntesi és més elevada que la de trencament. En canvi, en condicions de dejú, la taxa de trencament és superior a la síntesi, fet que causa un deteriorament de l'organisme. A més, les proteïnes, juntament amb la urea, l'àcid úric, l'amoniac, la creatina i la creatinina, entre d'altres, contribueixen a mantenir el balanç total de nitrogen. Per tots aquest motius, és necessari establir uns requeriments proteics mínims que siguin òptims per a cada espècie, tot diferenciant, si és possible, entre estats de creixement o situacions patològiques.

2.4. Requeriment d'aminoàcids sofrats en les dietes per a pollastres

Les dietes per l'aviram poden estar constituïdes per una barreja de cereals, farina de soia, farines d'origen animal, greixos, vitamines i minerals (Nutrient Requirements of Poultry, 1994). Aquests components, junt amb l'aigua, aporten l'energia i els nutrients necessaris per a un creixement i desenvolupament òptim i un bon estat de salut de l'animal.

Quan es parla de requeriments dietètics de proteïnes, de fet, es fa referència als requeriments d'aminoàcids. Una aportació dietètica de proteïnes, és a dir d'aminoàcids, inadequada comporta una reducció del creixement o de la productivitat. Aquests requeriments varien considerablement segons l'animal es destini a la producció de carn o d'ous. Els pollastres broiler, utilitzats com a animals d'engreix, tenen uns requeriments d'aminoàcids relativament elevats per tal de garantir un creixement ràpid i, per tant, productiu.

El valor biològic d'una proteïna està definit principalment per la proporció d'aminoàcids essencials que conté. En aquest sentit, tot el conjunt d'aminoàcids essencials només està present en les proteïnes d'origen animal. En canvi, en les proteïnes d'origen vegetal no tots es troben en quantitat suficient per assolir els requeriments, de manera que aminoàcids essencials com la lisina i la Met són limitants. Per aquesta raó, les dietes per l'aviram que contenen, com a ingredients principals, cereals i farines de llavor de soia són deficientes en Met (Nutrient Requirements of Poultry, 1994). Així doncs, els requeriments dels aminoàcids sofrats com la Met i Cys (**Taula 1**), que varia segons el període de creixement de l'animal, comporta un mínim de Met que s'ha de garantir (Nutrient Requirements of Poultry, 1994).

Requeriments (%)	0-3 setmanes	3-6 setmanes	6-8 setmanes
Met + cistina	0,90	0,72	0,60
Met	0,50	0,38	0,32

Taula 1. Requeriment d'aminoàcids sofrats (Nutrient Requirements of Poultry, 1994) per a pollastres broiler en una dieta de 3.200 kcal ME/kg. ME, energia obtinguda per la diferència entre l'energia bruta d'un aliment ingerit i l'energia total dels excrements, l'orina i els gasos que en resulten.

2.5. Suplements de Met en pinsos de pollastre

Atès doncs que les dietes per a l'aviram són deficitàries en Met, la indústria agroalimentària ha desenvolupat suplements dietètics d'aquest aminoàcid per tal d'assolir els requeriments. Les principals fonts comercials disponibles són la DL-Met i el seu corresponent hidroxianàleg, l'àcid DL-2-hidroxi-4-metiltiobutanoic (DL-HMB). Des del punt de vista estructural, el DL-HMB té un grup hidroxil en el carboni α (és un àcid α -hidroxicarboxílic), a diferència de la DL-Met que conté un grup amino en aquesta posició (**Figura 7**). El DL-HMB és un àcid orgànic amb un pKa de 3,6 i s'ha descrit que, com a tal, pot tenir un efecte bactericida i antifúngic tant en el pinso (Andrýs *et al.*, 2003) com en el tracte gastrointestinal de l'animal (Hinton *et al.*, 2000).

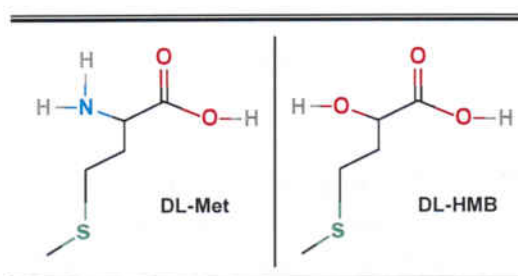


Figura 7. Estructura química de la DL-Met i del DL-HMB.

Mentre que la DL-Met es comercialitza principalment en forma sòlida, el DL-HMB es comercialitza en forma sòlida (sal de Ca^{2+}) i en forma líquida (àcid lliure). Les avantatges que suposa la forma líquida, a l'hora d'incorporar-lo al pinso per obtenir una barreja més uniforme, han promogut notablement la utilització del DL-HMB com a suplement de Met. En solució, com altres àcids α -hidroxicarboxílics, el DL-HMB està format per un equilibri dinàmic de formes monomèriques i no-monomèriques (principalment dímers i trimers). Aquesta

polimerització és el resultat de l'esterificació entre els grups carboxil i hidroxil de diferents molècules de DL-HMB (Lawson i Ivey, 1986). Segons la directiva europea sobre productes utilitzats en nutrició animal (82/471/ECC), el contingut total de formes monomèriques i no-monomèriques ha d'ésser com a mínim del 85%, de les quals s'ha de garantir un mínim d'un 65% de monòmer. El contingut en dímers, trímers i altres oligòmers és rellevant ja que s'ha descrit que aquestes formes no són utilitzades per l'intestí (Koban i Koberstein, 1984; Saunderson, 1991; Van Weerden *et al.*, 1992). Així doncs, cal pensar que és necessària la hidròlisi de les formes no-monomèriques per a què el DL-HMB sigui utilitzat satisfactòriament.

2.6. Absorció intestinal de les diferents fonts de Met

Ambdues fonts de Met difereixen en els mecanismes implicats en la seva absorció intestinal. En general, els nutrients són transportats a través de la membrana apical dels enteròcits per mecanismes que permeten la seva acumulació a l'interior en contra de gradient de concentració. Per assolir la circulació sistèmica, els nutrients travessen aleshores la membrana basolateral, en general, a favor del gradient de concentració, és a dir, per difusió simple o bé per difusió facilitada. Les principals característiques que, fins al moment, s'han descrit per al transport de la DL-Met i del DL-HMB corresponen pràcticament només al transport a través de la membrana apical. Així doncs, les esmentades diferències en l'absorció de les dues fonts de Met fan referència exclusivament al transport a través d'aquesta membrana.

2.6.1. Transport de DL-Met

A l'intestí de pollastre, la L-Met es transporta a través de la membrana apical gràcies a la participació de transportadors dependents i independents de Na^+ (Dibner *et al.*, 1992; Knight *et al.*, 1994), així com també per un procés de difusió passiva (Brachet i Puigserver, 1989). El component dependent de Na^+ està mediat pel sistema B (Brachet i Puigserver, 1987; Maenz i Engele-Schann, 1996a; Soriano-García *et al.*, 1998) i el component independent de Na^+ pels sistemes y^+ , $b^{0,+}$ i L (Soriano-García *et al.*, 1998). La D-Met sembla ésser substrat del mateix sistema de transport dependent de Na^+ , però amb més baixa afinitat i capacitat que la detectada per l'estereoisòmer L (Brachet *et al.*, 1987; Brachet i Puigserver, 1989). En cèl·lules Caco-2, Chen *et al.* (1994) suggereixen que en el transport apical de L-Met participa, a més, el sistema $B^{0,+}$ com a component majoritari del transport.

Les característiques dels diferents sistemes de transport implicats en el transport de L-Met es detallen a continuació i es troben resumides en la **Taula 2**:

▪ **Sistemes dependents de Na^+ de la membrana apical**

- **Sistema B.** Específic per al transport d'aminoàcids neutres, originàriament identificat com a sistema NBB (Stevens *et al.*, 1982; Munck i Munck, 1994a). El sistema B presenta una baixa selectivitat per als aminoàcids neutres però exclou els iminoàcids i els β -aminoàcids, i és inhibible per l'anàleg estructural àcid 2-aminobiciclo(2.2.1)-heptà-2-carboxílic (BCH) (Stevens *et al.*, 1982; Munck, 1985a). Es tracta d'un sistema de cotransport secundari amb Na^+ .
- **Sistema $\text{B}^{0,+}$.** És similar al sistema B pel que fa a la seva especificitat per transportar aminoàcids neutres, però a més és capaç de transportar aminoàcids catiónics i β -alanina, i també és inhibible per BCH (Munck, 1985a i 1985b; Andersen i Munck, 1987). Es tracta d'un sistema de cotransport secundari amb Na^+ i Cl^- .

▪ **Sistemes independents de Na^+ de la membrana apical**

- **Sistema $\text{b}^{0,+}$.** Transporta aminoàcids neutres i catiónics, i el dipèptid cistina (Chillarón *et al.*, 1996). Es tracta d'un bescanviador terciari, que preferentment transporta aminoàcids catiónics cap a l'interior de la cèl·lula bescanviant-los per aminoàcids neutres acumulats mitjançant altres sistemes de transport.
- **Sistema y^+ .** Transporta aminoàcids neutres i catiónics. És un sistema independent de Na^+ per a aminoàcids catiónics i és capaç d'interaccionar amb aminoàcids neutres però només en presència de Na^+ . És sensible a N-etilmaleimida (NEM) i està energitzat pel potencial de membrana (Devés *et al.*, 1993). En el pollastre es va anomenar y^{m} per la seva gran capacitat per transportar L-Met (Soriano-García *et al.*, 1998).
- **Sistema L.** És específic per al transport d'aminoàcids neutres amb cadena no polar voluminosa (ramificada o aromàtica) com la L-leucina, L-isoleucina, L-valina i L-fenilalanina. És inhibible per BCH (Stevens *et al.*, 1982). Es tracta d'un sistema de difusió facilitada.

Tradicionalment, els sistemes de transport d'aminoàcids es classifiquen funcionalment considerant principalment dos criteris (Christensen, 1990): 1) la dependència al Na^+ i 2) l'especificitat per al substrat. Més recentment, s'han clonat i identificat molecularment els gens que codifiquen per a moltes de les proteïnes involucrades en el transport d'aquests nutrients. Els diferents cDNAs clonats han estat agrupats en famílies en base a criteris d'identitat de la seqüència i a les propietats cinètiques dels seus productes quan s'expressen en sistemes d'expressió funcional com per exemple en oòcits de *Xenopus laevis*. Així doncs, en la Taula 2 també s'inclou la família a la qual pertanyen els diferents sistemes de transport descrits anteriorment.

sistemes de transport	família de gens	ions acoblats	aminoàcids transportats
B (NBB, B⁰)	SLC1 (ASCT2, hATB ⁰) ⁽¹⁾	Na^+	neutres
B^{0,+}	SLC6 (ATB ^{0,+}) ⁽²⁾	Na^+ , Cl^- ⁽³⁾	neutres i catiónics
b^{0,+}	SLC3 (rBAT) ⁽⁴⁾ /SLC7 (b ^{0,+} AT) ⁽⁵⁾	-	neutres i catiónics
y⁺ (y⁺m)⁽⁶⁾	SLC7 (CAT1) ⁽⁵⁾	- (Na^+)	catiónics (neutres)
L	SLC43 (LAT4) ⁽⁷⁾ /SLC7 (LAT2) ⁽⁵⁾	-	neutres

Taula 2. Sistemes de transport intestinals descrits per la Met. ⁽¹⁾Kanai i Hediger, 2004; ⁽²⁾Chen *et al.*, 2004; ⁽³⁾Munck i Munck, 1994b; ⁽⁴⁾Palacín i Kanai, 2004; ⁽⁵⁾Verrey *et al.*, 2003; ⁽⁶⁾Soriano-García *et al.*, 1998; ⁽⁷⁾Babu *et al.*, 2003.

2.6.2. Transport de DL-HMB

Està descrit que el DL-HMB travessa la membrana apical per difusió passiva (Dibner i Knight, 1984; Dibner *et al.*, 1988; Brachet i Puigserver, 1989) i per un mecanisme de transport no estereoespecífic, independent de Na^+ (Brachet i Puigserver, 1987 i 1989) i dependent del gradient de H^+ (Maenz i Engele-Schann, 1996a; Pan *et al.*, 2002). Atès però que encara no ha estat identificat, un dels objectius del present treball ha estat caracteritzar el sistema implicat en el transport del DL-HMB a través de la membrana apical. Tenint en compte tant la seva estructura química com la dependència del gradient de H^+ , s'ha considerat la possible participació dels següents sistemes dependents de H^+ que, *a priori*, per la seva especificitat de substrat, podrien reconèixer el DL-HMB:

- **Sistema PAT1 (Proton Amino acid Transporter 1).** El grup de transportadors PAT, que pertany a la família de gens SLC36 (Boll *et al.*, 2004), inclou quatre membres, dels quals només el sistema PAT1 s'expressa en la membrana apical (Chen *et al.*, 2003;

Anderson *et al.*, 2004). Aquest sistema de transport mostra una elevada afinitat per als α -aminoàcids de cadena curta (glicina, L-prolina, L-alanina, L-serina), β -aminoàcids (β -alanina) i γ -aminoàcids (àcid γ -aminoisobutíric o GABA) (Boll *et al.*, 2002 i 2004; Chen *et al.*, 2003). També pot transportar osmòlits com la betaïna, sarcosina i Tau, a més d'alguns D-aminoàcids com la D-alanina, D-prolina i D-serina (Chen *et al.*, 2003). A més, els àcids grassos de cadena curta (SCFA) con l'acetat, propionat i butirat també són reconeguts per PAT1 (Foltz *et al.*, 2004). Així doncs, aparentment el grup amino no és essencial per al reconeixement del substrat (Boll *et al.*, 2003).

- **Sistema PepT1 (*Peptide Transporter 1*).** Aquest sistema, que pertany a la família de gens SLC15 (Daniel i Kottra, 2004), és el responsable del transport de dipèptids i tripèptids, així com d'altres substrats farmacològicament actius (Thwaites *et al.*, 1993a; Ganapathy *et al.*, 1995; Tamai *et al.*, 1998). A l'enteròcit, s'expressa principalment a la membrana apical (Ogihara *et al.*, 1996). El requeriment estructural mínim del substrat per ésser reconegut és la presència de dos grup ionitzats separats per almenys quatre grups metilens (Döring *et al.*, 1998). Així doncs, l'enllaç peptídic no és necessari per al reconeixement del substrat i l'àcid 5-aminopentanoic és el substrat més petit que pot reconèixer (Döring *et al.*, 1998).

- **Sistema MCT1 (*Monocarboxylate Transporter 1*).** El grup de transportadors MCT, que pertany a la família de gens SCL16, inclou un gran nombre d'isoformes, de les quals el sistema MCT1 es troba en un gran nombre de teixits i espècies animals (Halestrap i Meredith, 2004). A l'intestí, el transportador MCT1 s'expressa principalment a la membrana apical (Hadjiagapiou *et al.*, 2000; Buyse *et al.*, 2002), mentre que MCT3, MCT4 i MCT5 es localitzen a la membrana basolateral (Gill *et al.*, 2005). L'activitat del sistema MCT1 és essencial per al transport de molts àcids monocarboxílics i altres substrats farmacològicament actius. En general, els substrats que reconeix són àcids orgànics febles, amb un grup carboxil i una cadena lateral relativament curta de caràcter tant hidrofòbic com hidrofílic (Enerson i Drewes, 2003). A més, el sistema tolera i fins i tot prefereix substitucions en C2 i C3 (excepte grups amino), com en el cas del piruvat, L-lactat, acetoacetat i β -hidroxibutirat (Halestrap i Meredith, 2004). Aparentment, el millor candidat per al transport de DL-HMB ja que, abans de la identificació d'aquest sistema, Brachet i Puigserver (1989) ja relacionaven el seu transport amb el de L-lactat, que, de fet, és l'hidroxianàleg de la L-alanina. A més, Friedrich *et al.* (1991) varen descriure que l'hidroxianàleg de la L-leucina també és transportat per un mecanisme dependent de H^+ sensible a la inhibició amb L-lactat.

2.7. Cultius de cèl·lules Caco-2 com a model per a l'estudi de l'absorció intestinal

Les cèl·lules de la línia cel·lular Caco-2, establerta a partir d'un adenocarcinoma de còlon humà, es diferencien espontàniament durant el desenvolupament del cultiu i assoleixen unes característiques morfològiques, bioquímiques i funcionals comparables a les dels enteròcits madurs de l'intestí prim (Pinto *et al.*, 1983; Hidalgo *et al.*, 1989). Així, en condicions de cultiu adients, aquestes cèl·lules creixen de forma exponencial fins arribar a la confluència, aproximadament 5-7 dies després de la sembra. A partir d'aquest moment, comença el procés de diferenciació, que s'assoleix aproximadament 21 dies després de la sembra i que es caracteritza per:

- organització cel·lular formant una monocapa polaritzada
- presència de microvil·lis desenvolupats (**Figura 8**)
- formació de complexos d'unions intercel·lulars
- expressió d'hidrolases intestinals
- expressió dels sistemes de transport característics de l'enteròcit madur

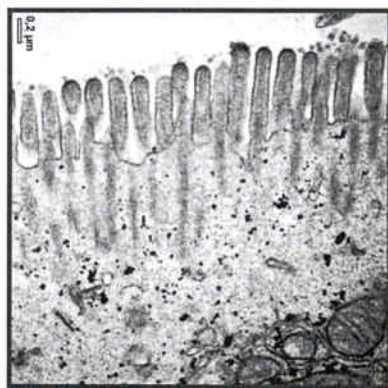


Figura 8. Imatge obtinguda per microscòpia electrònica de transmissió de la vora en raspall de cèl·lules Caco-2 als 24 dies de la sembra.

La utilització d'aquesta línia cel·lular en el camp de la Nutrició, la Farmacologia i la Toxicologia ha augmentat notablement en els darrers anys (Artursson *et al.*, 2001) i constitueix un bon model *in vitro* per estudiar el procés de diferenciació de l'epiteli intestinal (Hidalgo *et al.*, 1989; Martín-Venegas *et al.*, 2006a) i per la caracterització dels sistemes de transport de nutrients (Thwaites *et al.*, 1993a, 1993b i 1996; Chen *et al.*, 1994; Hadjiagapiou

et al., 2000; Stein *et al.*, 2000) així com la seva regulació per components de la dieta (Walker *et al.*, 1998; Shimizu i Satsu, 2000).

2.8. Metabolisme de les diferents fonts de Met

Després d'ésser absorbits, el DL-HMB i la D-Met han d'ésser convertits enzimàticament a L-Met (Gordon i Sizer, 1965) per a poder ésser utilitzats en la síntesi de proteïnes i altres funcions metabòliques. Les vies metabòliques que tant les diferents fonts de Met com la L-Met poden seguir s'esquematitzen en la **Figura 9** i es descriuen a continuació.

2.8.1. Conversió de D-Met i DL-HMB en L-Met

En una primera etapa, tant la D-Met com el DL-HMB són oxidats a 2-keto-4-metiltiobutirat (KMB). En el cas de la D-Met, l'enzim responsable és la D-aminoàcid oxidasa (D-AAOX, EC 1.4.3.3), localitzat en els peroxisomes del ronyó i fetge del pollastre, així com també al llarg de l'epiteli intestinal (Dupuis *et al.*, 1989), essent el duodè el segment intestinal que presenta més activitat (Brachet i Puigserver, 1992). El DL-HMB també és oxidat en una primera etapa a KMB per un procés enzimàtic estereoespecífic. El L-HMB és substrat de la L-2-hidroxiàcid oxidasa (L-HAOX, EC 1.1.3.15) present majoritàriament en els peroxisomes del fetge (Dibner i Knight, 1984; Dibner i Ivey, 1992) i ronyó del pollastre (Gordon i Sizer, 1965) i rata (Langer, 1965). En canvi, el D-HMB és oxidat per l'enzim D-2-hidroxiàcid deshidrogenasa (D-HADH, EC 1.1.99.6), localitzat en la fracció mitocondrial de diferents teixits, incloent-hi la mucosa intestinal (Knight i Dibner, 1984). Aquesta localització suggereix que el D-HMB podria ésser convertit a L-Met a l'intestí ja durant el procés d'absorció (Dupuis *et al.*, 1989).

En una segona etapa, comú per a la D-Met i per al DL-HMB, el KMB és transaminat per formar L-Met gràcies a la intervenció de diferents transaminases. Hi ha diversos estudis que intenten determinar quin és l'aminoàcid que transfereix el seu grup amino en aquest procés. En pollastres, l'aminoàcid responsable encara és objecte de controvèrsia. S'ha descrit que, *in vitro*, la L-leucina, L-valina i L-soleucina són els candidats més idonis (Gordon i Sizer, 1965), mentre que la L-glutamina és inefectiva (Harter i Baker, 1977). En canvi, en un altre estudi *in vivo* es conclou que aquests aminoàcids no transfereixen el seu grup amino (Featherston i Horn, 1974). Més recentment, Rangel-Lugo i Austic (1998) han determinat, també en pollastre, que tots els aminoàcids assajats (L-soleucina, L-leucina, L-valina, L-glutamina, L-aspartat, L-alanina, L-glicina, L-asparagina i L-fenilalanina) promouen la síntesi

de L-Met a partir de KMB tant en homogenat de teixit com en la fracció mitocondrial i citosòlica de fetge, ronyó, intestí i múscul.

Hi ha autors que detecten que la velocitat d'oxidació per la D-Met és comparable, en condicions saturants de substrat, a la del DL-HMB (Dibner i Ivey, 1992; Barnes *et al.*, 1995). Altres, però, indiquen que en homogenats de diversos teixits de pollastre i per a qualsevol concentració utilitzada, la D-Met és més ràpidament convertida a KMB que l'hidroxianàleg (Dupuis *et al.*, 1989).

2.8.2. Metabolisme de la L-Met

La major part de la L-Met cel·lular disponible, s'incorpora junt amb altres aminoàcids a la síntesi de proteïnes i la resta es metabolitza per processos de transmetilació, remetilació, transulfuració i transaminació (Figura 9):

- Transmetilació. La L-Met pot formar S-adenosil-L-metionina (SAM), reacció catalitzada per l'enzim metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6). La SAM pot patir dos tipus de reaccions:
 - a) pot descarboxilar-se gràcies a l'acció de la SAM descarboxilasa (EC 4.1.1.50) per formar SAM descarboxilada (dSAM), substrat essencial per a la síntesi de les poliamines espermidina i espermina (Stipanuk, 1986; Pegg *et al.*, 1998). Aquesta síntesi comporta la formació de 5'-metiltioadenosina, que pot ésser reciclada a L-Met.
 - b) pot transmetilar-se, participant així en la síntesi de components essencials com són la creatina, carnitina, fosfolípids, proteïnes, ADN i ARN, entre altres. Cal tenir present, doncs, que la SAM és el principal donador de grups metil de l'organisme. El coproducte resultant d'aquesta transmetilació és la S-adenosilhomocisteïna (SAH). Aquesta, és hidrolitzada per la SAH hidrolasa (EC 3.3.1.1) per donar adenosina i homocisteïna (Eloranta i Kajander, 1984). L'homocisteïna generada pot patir reaccions de remetilació o de transulfuració, essent considerada com un punt de regulació important en el metabolisme de la L-Met.

- **Remetilació.** Permet la regeneració de L-Met a partir d'homocisteïna, utilitzant la transferència d'un grup metil de diferents substrats. La transferència d'un grup metil a partir de N⁵-metil-tetrahidrofolat està catalitzada per la metionina sintasa (N⁵-metil-tetrahidrofolat-homocisteïna metiltransferasa, EC 2.1.1.13), àmpliament distribuïda per l'organisme, tant en mamífers com en aus. La transferència d'un grup metil a partir de la betaïna està catalitzada per la betaïna-homocisteïna metiltransferasa (EC 2.1.1.5), present majoritàriament en el fetge del pollastre (Emmert *et al.*, 1996) i en mamífers també es troba en ronyó (Finkelstein i Martin, 1984).
- **Transulfuració.** L'homocisteïna transfereix irreversiblement el seu grup sulfur a una molècula de serina per formar cistationina gràcies a l'acció de l'enzim cistationina β -sintasa (EC 4.2.1.22), fet que es relaciona amb que la transulfuració és un flux unidireccional de L-Met per formar L-Cys. La cistationina és hidrolitzada per la cistationina γ -liasa (cistationasa; EC 4.4.1.1) a L-Cys, α -ketobutirat i amoníac. L' α -ketobutirat continua catabolitzant-se per oxidació i forma propinil-CoA, que entrarà al cicle dels àcids tricarboxílics. Per tant, la via de la transulfuració és responsable tant del catabolisme de la cadena carbonada de la L-Met com de la transferència del grup sulfur a la serina per sintetitzar L-Cys.
- **Transaminació.** La L-Met pot metabolitzar-se per una via alternativa que comporta la seva transaminació a KMB per acció de diferents transaminases (Case i Benevenga, 1977; Benevenga, 1984). El KMB és decarboxilat a 3-metiltiopropionil-CoA, que a la vegada es metabolitza a metantiol, SH₂ i CO₂, entre altres. Aquesta és una via de degradació de la L-Met.

Totes les cèl·lules tenen la capacitat per dur a terme reaccions de transmetilació i remetilació, processos que formen part del que molts autors descriuen com a cicle de la Met. En canvi, la via de la transulfuració, similar en mamífers i aus (Emmert *et al.*, 1996), està restringida al fetge, pàncreas, ronyó, intestí prim, cervell i teixit adipós (Gaull i Gaitonde, 1967; Finkelstein, 1990) i és la via metabòlica preferent per al metabolisme del sofre de la L-Met (Stipanuk, 1986).

2.8.3. Metabolisme de la L-Cys

La L-Cys és un aminoàcid precursor en la síntesi de proteïnes, a més d'altres molècules essencials com el glutatió (GSH), Tau i el sofre inorgànic, entre altres. La síntesi de GSH, tripeptid format per L-glutamina, L-Cys i L-glicina, té lloc en dues reaccions. En primer lloc,

la γ -glutamilcisteïna sintasa (EC 6.3.2.3) catalitza la reacció entre la L-glutamina i la L-Cys per formar γ -glutamilcisteïna. En segon lloc, es forma GSH per acció de la GSH sintasa (glutamina-cisteïna ligasa, EC 6.3.2.2) que catalitza la reacció entre la L-glicina i la γ -glutamilcisteïna. El GSH es considera una reserva de L-Cys ja que pot ésser hidrolitzat per generar L-Cys en cas necessari (Tateishi *et al.*, 1977) per acció de la γ -glutamyltranspeptidasa i per la cisteïnilglicina dipeptidasa.

A més de la formació de GSH, la L-Cys pot seguir altres vies metabòliques. En menor mesura, pot desulfurar-se per donar piruvat i sulfur reduït en forma de tiocisteïna, mercaptopiruvat o tiosulfat, entre altres. Com a via principal però, la L-Cys s'oxida a cisteïnsulfinat, reacció catalitzada per la cisteïna dioxigenasa (EC 1.13.11.20). El cisteïnsulfinat pot seguir dues rutes: 1) descarboxilar-se per formar hipotaurina gràcies a l'acció de la cisteïnasulfinat descarboxilasa (EC 4.1.1.29), enzim expressat principalment al fetge i molt limitada en altres òrgans i teixits (Stipanuk *et al.*, 2002). La hipotaurina es converteix per una via no enzimàtica a Tau, mol·lècula de comportament anàleg al d'un aminoàcid on el grup carboxil està substituït per un grup sulfònic; 2) oxidar-se a cisteat que, en descarboxilar-se, forma Tau. Per tant, l'oxidació de L-Cys comporta la formació d'ambdós Tau i sulfat.

2.9. Funcions de la L-Met i dels seus metabòlits

La L-Met és un aminoàcid essencial necessari per a desenvolupar moltes funcions metabòliques importants. A més del seu paper com a constituent de les proteïnes, cal destacar que és el principal donador de grups metil de l'organisme, a través de la SAM (Cooper, 1983; Finkelstein, 1990). Els processos de metilació, com per exemple els de metilació de fosfolípids, proteïnes, polisacàrids i àcids nucleics són crucials per l'organisme (Chiang *et al.*, 1996). Canvis en la metilació afecten la diferenciació cel·lular (Jaenisch i Bird, 2003), i per tant, tenen implicacions en teixits on la renovació de cèl·lules és contínua, com en el cas del sistema digestiu. L'alteració en els processos de metilació de l'ADN es relaciona amb una desregulació del creixement i de la diferenciació cel·lular (Wainfan i Poirier, 1992), així com també amb la patogènia del càncer, autoimmunitat i algunes disfuncions cel·lulars associades a l'edat (Richardson, 2002). A més, la L-Met transfereix tres grups metil per completar la síntesi de colina, que actua com a un agent lipotrópic en el metabolisme hepàtic dels àcids grassos, de manera que prevé l'acumulació de quantitats nocives de greixos en el fetge. Per aquest motiu, s'ha descrit que cal assegurar uns nivells adequats de L-Met per evitar la deposició hepàtica en el pollastre (Esteve-Garcia i Llauredó,

1997). La L-Met també és un de les promotores de la síntesi de poliamines (Pegg, 1986) com l'espermidina i l'espermina que intervenen promovent processos de proliferació i diferenciació cel·lular (Heby *et al.*, 1991). S'ha descrit que un excés de Met estimula la síntesi de poliamines que comporta un increment en la proliferació cel·lular (Duranton *et al.*, 1999).

A més, la L-Met participa en la síntesi de L-Cys, que a la vegada, és un precursor en la síntesi de proteïnes, i és el factor limitant en la síntesi de GSH i Tau (Tateishi *et al.*, 1974; Lu, 1999). Es considera que la L-Cys té un efecte "estalviador" de L-Met ja que redueix el catabolisme de la L-Met per la via de la transulfuració (Finkelstein i Mudd, 1967; Stipanuk i Benevenga, 1977), permetent així que la L-Met s'utilitzi en altres funcions. En canvi, la L-Cys no pot suplir la L-Met ja que la transulfuració és una via irreversible. Així doncs, els nivells de L-Cys han d'ésser òptims per a que tots aquests processos s'assoleixin adequadament. La L-Cys té una gran importància biològica ja que els ponts disulfur entre dos molècules intervenen en l'estabilització de la conformació terciària i quaternària de les proteïnes. La L-Cys i la cistina, constitueixen un important sistema redox extracel·lular (Lu, 1999), participant com a antioxidant en l'epiteli intestinal (Shoveller *et al.*, 2005). A més, diversos estudis han demostrat que juga un paper molt important en processos de proliferació cel·lular (Livingston *et al.*, 1976; Uren i Lazarus, 1979). D'altra banda, el GSH participa en la detoxificació de radicals lliures i peròxids (Kleinman i Richie, 2000) i la regulació del creixement cel·lular ja que participa tant en processos d'apoptosi (Cai i Jones, 1998; Voehringer, 1999; Wang *et al.*, 2000; Nkabyo *et al.*, 2002;) com de proliferació (Obrador *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1999). Martensson *et al.* (1990) varen demostrar que el GSH és essencial per al bon funcionament de l'epiteli intestinal ja que un dèficit en la dieta provoca una degeneració severa de les cèl·lules epitelials del jejú i del còlon. La Tau és un β -aminoàcid que intervé en processos de conjugació d'àcids biliars i detoxificació (Wright *et al.*, 1986; Huxtable, 1992; O'Flaherty, 1997; Lambert, 2004), i que actua com a estabilitzador de la membrana, osmoregulator (Pasantes-Morales *et al.*, 1998) i antioxidant (Roig-Pérez *et al.*, 2004).

2.10. Dèficit i toxicitat de la Met

De manera general, un dèficit en l'aportació dietètica d'aminoàcids essencials dona lloc a una correlació inversa amb el creixement de l'animal (Zimmerman i Scott, 1965; Baker *et al.*, 1966; Kaufman *et al.*, 1966). La resposta davant un dèficit de Met és l'activació de la seva síntesi a partir de l'homocisteïna per cobrir, en la mesura que sigui possible, la síntesi de proteïnes. En aquest sentit, diferents estudis posen de manifest una reducció en els

nivells de cistationina (Finkelstein i Mudd, 1967) i un increment considerable de l'activitat betaïna-homocisteïna metiltransferasa tant en rates (Finkelstein *et al.*, 1982) com en pollastres (Emmert *et al.*, 1996). A més, també s'ha descrit que una dieta pobre en aminoàcids sofrats provoca un augment de l'activitat γ -glutamylcisteïna sintasa i una disminució de l'activitat cisteïna dioxigenasa, suggerint que en aquestes condicions la síntesi de GSH és més activa que el catabolisme per formar Tau i sulfat (Bella *et al.*, 1999).

L'aportació excessiva de Met a la dieta es caracteritza per una pèrdua de pes considerable (Katz i Baker, 1975; Harter i Baker, 1978; Carew *et al.*, 1998), acompanyada d'una davallada molt important en el consum de pinso (Benevenga i Harper, 1967; Edmonds i Baker, 1987) i d'una reducció en el seu índex de conversió (Acar *et al.*, 2001). Fins i tot, un excés modest de Met pot provocar una disminució del consum de pinso sense que s'observi cap pèrdua de pes de l'animal (Han i Baker, 1993) ni cap alteració en la producció d'ous (Koelkebeck *et al.*, 1991). En aquest sentit, s'ha observat que un excés de D-Met provoca un pèrdua de pes menor en comparació amb la L- i DL-Met (Harper *et al.*, 1970; Katz i Baker, 1975) i que els animals joves són més susceptibles a la toxicitat de la DL-Met en comparació amb els adults (Abe *et al.*, 2000).

Alguns autors suggereixen que l'acumulació d'homocisteïna és la responsable, almenys en part, de la depleció de creixement per un excés de Met (Cohen *et al.*, 1958; Katz i Baker, 1975; Hafez *et al.*, 1978; Ueland i Refsum, 1989). Altres autors també postulen que un excés de Met augmenta la via de la transaminació i, per tant, un increment de la producció de metabòlits tòxics com el metantol i SH₂ (Steele i Benevenga, 1979; Steele *et al.*, 1979; Finkelstein i Benevenga, 1984). En aquest sentit, s'ha descrit que el KMB és millor precursor per la síntesi de metantol que la L-Met (Canellakis i Tarver, 1953). També s'ha descrit que una dieta amb un excés de Met provoca, en el fetge, un augment de l'activitat cisteïna dioxigenasa, cistationina β -sintasa i cistationina γ -liasa (Stipanuk, 1979; Bella i Stipanuk, 1995 i 1996) i una disminució de l'activitat γ -glutamylcisteïna sintasa (Bella *et al.*, 1996). Aquesta resposta suposa una disminució en la síntesi hepàtica de GSH a favor d'un increment en el catabolisme de L-Cys per formar Tau i sulfat, és a dir, que un excés de Met sembla incrementar la degradació d'aquest aminoàcid a través de la via de la transulfuració (Stipanuk *et al.*, 2002; Stipanuk, 2004). A més, s'ha demostrat que els aminoàcids sofrats presents en la dieta també afecten al contingut de Tau en altres teixits, entre ells l'intestí prim (Satsu *et al.*, 2002). Així doncs, en general, un excés de Met en la dieta facilita la transulfuració i limita la remetilació; en canvi, un dèficit de Met estimula la conservació de la Met i per tant la via de la transulfuració queda més restringida. En aquest sentit també s'ha descrit que mentre en dietes per a pollastres amb una aportació adequada de Met i Cys, la

betaïna-homocisteïna metiltransferasa només contribueix en una petita proporció a la remetilació de l'homocisteïna (Emmert *et al.*, 1996), en estats de deficiència o excés de Met, aquest enzim pren un paper més rellevant en la regulació dels nivells de Met (Emmert *et al.*, 1996; Saunderson i MacKinlay, 1990).

Pel que fa a la toxicitat de l'hidroxianàleg, els estudis de Griminger i Fisher (1968) posen de relleu que la pèrdua de pes és menor en comparació amb la Met. A més, Katz i Baker (1975) descriuen que per observar els mateixos efectes tòxics cal que la concentració de DL-HMB sigui el doble que la de DL-Met. Griminger i Fisher (1968) postulen que la menor toxicitat pot ésser atribuïda a una conversió limitant de l'hidroxianàleg en L-Met però el seu treball conclou que la conversió no pot explicar aquesta menor toxicitat.

2.11. Treballs comparatius entre DL-HMB i DL-Met

Els estudis comparatius que la bibliografia aporta no tenen una interpretació fàcil ja que els resultats depenen, d'entre altres factors, de l'espècie d'animal utilitzada, la composició de la dieta i el teixit o òrgan sotmès a estudi. Així doncs, les possibles diferències entre ambdues fonts són encara objecte de debat.

Fa més de cinquanta anys que la bibliografia recull treballs on el DL-HMB és utilitzat com a font de Met (Gordon i Sizer, 1955). Des d'aleshores, s'ha portat a terme una àmplia varietat d'estudis per tal de determinar si el DL-HMB pot substituir de manera òptima la Met en els pinsos comercials. Els estudis que habitualment es realitzen consisteixen en comparar la producció d'ous o la taxa de creixement dels pollastres alimentats amb una o altra font. En aquests estudis, alguns autors conclouen que el DL-HMB és equivalent a la Met (Gordon i Sizer, 1955), mentre que d'altres conclouen que la seva eficàcia nutricional és inferior (Tipton *et al.*, 1966; Boebel i Baker, 1982; Van Weerden *et al.*, 1992; Esteve-Garcia i Austic, 1993). Si es compara la ingesta de pinso, s'ha descrit que els pollastres alimentats amb DL-Met tendeixen a una ingesta menor (Rostagno i Barbosa, 1995), sobretot quan augmenta el nivell de suplementació (Summers *et al.*, 1987).

Per tal d'estudiar la base de la menor eficàcia nutricional atribuïda al DL-HMB, cal posar atenció en aquells processos on ambdues fonts poden diferir. Una de les principals diferències entre ambdues fonts de Met és l'absorció intestinal. Alguns treballs (Tipton *et al.*, 1966; Lerner *et al.*, 1969; Baker, 1976; Brachet i Puigserver, 1987 i 1989) suggereixen que l'absorció del DL-HMB és menor que la de la Met, fet que pot comportar, a més, un

increment del temps d'exposició del DL-HMB a la flora intestinal que pot transformar-lo en compostos no absorbibles en el seu pas per l'intestí prim (Maenz i Engele-Schaan, 1996b; Lemme *et al.*, 2002; Drew *et al.*, 2003). Cal tenir present, però, que Esteve-Garcia i Austic (1993) relacionen aquests compostos no absorbibles amb impureses del producte radioactiu utilitzat en l'estudi, i per tant, conclouen que l'absorció intestinal no pot explicar la menor eficàcia nutricional descrita per al DL-HMB. En aquest sentit, hi ha treballs que no descriuen diferències en la capacitat de transport per a ambdós substrats tant en anells evertits (Knight i Dibner, 1984; Richards *et al.*, 2005) com en vesícules de la vora en raspall (Maenz i Engele-Schaan, 1996a) de l'intestí de pollastre. Cal considerar, a més, que alguns estudis descriuen que el DL-HMB es pot absorbir també a l'intestí gruixut del pollastre (Dibner *et al.*, 1988; Knight *et al.*, 1998). En aquest sentit, Han *et al.* (1990) conclouen que, si es té en compte tot el sistema digestiu, ambdós substrats s'absorbeixen de manera eficient. A més, també s'ha descrit que, en situacions d'estrès calòric, l'absorció del DL-HMB és major en comparació amb la DL-Met (Dibner *et al.*, 1992; Knight *et al.*, 1994) tot i que hi ha autors que no detecten diferències (Rostagno i Barbosa, 1995). Knight *et al.* (1994) indiquen que l'efecte de l'estrès calòric està mediat per una reducció en l'absorció de la D-Met, fet que podria explicar per què el DL-HMB té avantatges en aquesta situació. En aquest sentit, Maenz i Engele-Schaan (1996b) postulen que l'exposició a temperatures elevades podria reduir la capacitat de les cèl·lules epitelials per generar energia, fet que provocaria una disfunció de l'ATPasa Na^+/K^+ de la membrana basolateral, reduint així el gradient de Na^+ amb la conseqüent reducció del transport de DL-Met.

Pel que fa a l'excreció urinària, també hi ha certes discrepàncies ja que mentre que els estudis de Saunderson (1985) i de Rostagno i Barbosa (1995) aporten una excreció del DL-HMB superior a la de la DL- o L-Met, Esteve-Garcia i Austic (1993) calculen que l'excreció urinària del DL-HMB és despreciable i que, per tant, aquest procés no pot explicar la menor eficàcia nutricional atribuïda al DL-HMB.

D'altra banda, hi ha estudis (Harter i Baker, 1977; Han *et al.*, 1990) que suggereixen que les diferències entre ambdós substrats podrien estar relacionades amb la conversió del DL-HMB en L-Met i, per tant, amb la disponibilitat d'aquest aminoàcid, essent la primera fase d'oxidació a KMB el factor limitant en aquest procés (Harter i Baker, 1977). Tanmateix, s'ha descrit que la síntesi hepàtica de proteïnes a partir de DL-HMB i L-Met és equivalent tant *in vitro* (Dibner, 1983) com *in vivo* (Saunderson, 1985), però cal tenir en compte que l'estudi de Saunderson (1987) reporta diferències en la incorporació de proteïnes en teixits no hepàtics i conclou que en aquests teixits podria raure la raó de la menor eficàcia nutricional de l'hidroxianàleg.

3.1. Estudis a l'intestí de pollastre

3.1.1. Materials

L'anestèsic Zoletil® (tiletamina-zolazepam) és de Virbac (Carros, França). El DL-HMB (Rhodimet™ AT88) i DL-HMB-PCM han estat cedits per Adisseo France, S.A.S (Antony, França). La DL-Met utilitzada com a suplement en les dietes experimentals correspon al producte comercial Rhodimet™ NP99 també d'Adisseo France, S.A.S. La resta de reactius s'han adquirit a Sigma (St. Louis, MO, E.U.A).

3.1.2. Animals d'experimentació

Els animals d'experimentació utilitzats en aquest estudi han estat pollastres mascles (*Gallus gallus domesticus* L., soca Ross 308) procedents de la Granja Crusvi, S.A (Montblanc, Catalunya). S'han obtingut el mateix dia de l'eclosió i s'han mantingut durant 18-21 dies en el Servei d'Estabulari de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona en condicions estandarditzades de temperatura (26-28°C) i humitat relativa (40-60%), amb un cicle de 18 hores de llum i 6 hores de foscor. Els animals s'han distribuït en les diferents gàbies homogeniament, respectant una densitat aproximada d'1 pollastre per 500 cm² de superfície.

Els protocol experimental ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona, d'acord amb les regulacions actuals per a l'ús i manipulació d'animals d'experimentació (Decret 214/97, Generalitat de Catalunya).

3.1.3. Fonts de Met utilitzades en les dietes experimentals

En les diferents dietes experimentals s'han utilitzat els següents productes com a font de Met:

- ⇒ **DL-HMB-PCM**: hidroxianàleg de la Met en forma líquida que correspon a la sal amònica, amb una puresa de producte del 80%. En la seva composició conté majoritàriament monòmers, tal i com es mostra a la **Taula 3**.

- ⇒ **DL-HMB**: hidroxianàleg de la Met en forma líquida que correspon a l'àcid, amb una puresa de producte del 88%. En la seva composició conté monòmers, dímers i altres oligòmers, tal i com es mostra a la Taula 3.
- ⇒ **DL-Met**: forma racèmica de l'aminoàcid en forma sòlida, amb una puresa de producte del 99%.

g/kg producte	DL-HMB-PCM	DL-HMB
monòmer	796 (sal amònica)	680 (àcid)
dímer	3	170
trímer	1	30
H ₂ O	200	120
mol/kg producte	4,84	5,96

Taula 3. Composició del DL-HMB-PCM i DL-HMB. El DL-HMB-PCM conté monòmer en forma de sal amònica, mentre que el monòmer del DL-HMB correspon a l'àcid.

A la Taula 3 també es mostren els mols de monòmer per kg de producte (mol/kg producte), considerant que cada dímer correspon a dos monòmers i cada trímer a tres monòmers.

3.1.4. Composició de les dietes experimentals

Els pollastres s'han alimentat *ad libitum*, des de l'eclosió fins al dia del sacrifici als 18-21 dies, amb diferents dietes dissenyades i preparades al Centre Mas Bové (Reus, Catalunya) de l'IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Generalitat de Catalunya). S'han assajat tres dietes de composició idèntica però que difereixen en la font de Met utilitzada (DL-HMB-PCM, DL-HMB o DL-Met). Els ingredients i la composició en nutrients calculada de les diferents dietes, així com l'energia metabolitzable corresponent, es mostren a la **Taula 4**.

Cal fer esment que els experiments en els que s'ha utilitzat DL-HMB-PCM, DL-HMB i L-Met com a substrat s'han realitzat en pollastres alimentats amb DL-HMB-PCM, DL-HMB i DL-Met, respectivament.

Dietes experimentals	DL-HMB-PCM	DL-HMB	DL-Met
Ingredients (%)			
Blat (13,9 % de proteïna)	15,63	15,63	15,63
Blat de moro (8,5 % de proteïna)	30,16	30,16	30,16
Greix alimentari	3,00	3,00	3,00
Pèsol (20,2 % de proteïna)	18,00	18,00	18,00
Farina de soja (47% de proteïna)	18,08	18,08	18,08
Soja integral extrusionada (35,3 % de proteïna)	11,11	11,11	11,11
Clorhidrat de L-lisina	0,035	0,035	0,035
Carbonat de calci	1,18	1,18	1,18
Fosfat bicàlcic	1,93	1,93	1,93
Clorur de sodi	0,45	0,45	0,45
Corrector vitamínic i mineral ^a	0,40	0,40	0,40
Clorur de colina, 50%	0,01	0,01	0,01
Nicarbazina, mg/kg	125	125	125
Composició en nutrients (%)			
Proteïna	20,80	20,80	20,80
Fibra	3,50	3,50	3,50
Extracte eteri	7,00	7,00	7,00
Lisina	1,21	1,21	1,21
Met	0,29	0,29	0,29
Met + cistina	0,62	0,62	0,62
DL-HMB-PCM	0,33	-	-
DL-HMB	-	0,27	-
DL-Met	-	-	0,24
Treonina	0,77	0,77	0,77
Triptòfan	0,22	0,22	0,22
Calci	1,00	1,00	1,00
Fòsfor total	0,71	0,71	0,71
Fòsfor inorgànic	0,45	0,45	0,45
Sodi	0,12	0,12	0,12
Clorurs	0,29	0,29	0,29
Energia metabolitzable	3050 kcal/kg pinso $\equiv$ 12,75 MJ/kg pinso		

Taula 4. Ingredients i composició en nutrients de les dietes experimentals. ^aCada kg de pinso conté: vitamina A, 12000 UI; vitamina D₃, 2400 UI; vitamina E, 30 mg; vitamina K, 3 mg; vitamina B1, 2,2 mg; vitamina B2, 8 mg; vitamina B6, 5 mg; vitamina B12, 11 µg; àcid fòlic, 1,5 mg; biotina, 150 µg; pantotenat de calci, 25 mg; àcid nicotínic, 65 mg; Mn, 60 mg; Zn, 40 mg; I, 0,33 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Se, 0,15 mg; etoxiquina, 150 mg.

3.1.5. Tècnica dels sacs evertits

▪ **Fonament.** El disseny experimental escollit ha estat la tècnica dels sacs evertits descrita per Wilson i Wiseman (1954). Aquesta tècnica fou un dels primers models *in vitro* desenvolupats per a l'estudi de l'absorció intestinal de gran diversitat de compostos. És una tècnica relativament simple i reproduïble que permet quantificar el substrat acumulat en la paret intestinal i el transport des del compartiment apical al basolateral.

▪ **Protocol experimental.** Els animals es pesen, s'anestesien amb 60 mg/kg de Zoletil® i es sacrifiquen per decapitació sense dejuni previ. Acte seguit es dessagnen, se'ls practica una laparotomia i es procedeix a l'extracció del duodè (nansa pancreàtica), jejú (6 cm proximal i distal al diverticle de Meckel) i ili (regió connectada per mesenteri als cecs) (Figura 10).

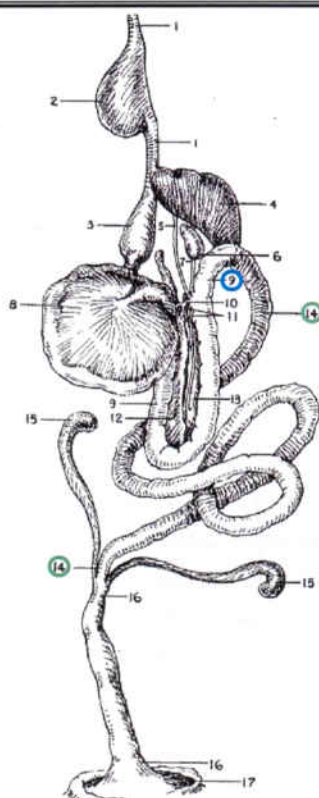


Figure 36. Digestive tract of the chicken.

1 and 2, esophagus and crop; 3, proventriculus; 4, liver; 5, hepatic duct; 6, gall bladder; 7, cystic duct or duct from gall bladder; 8, gizzard; 9, duodenum; 10, pancreatic ducts from dorsal lobe; 11, pancreatic ducts from ventral lobe; 12, dorsal lobe of pancreas; 13, ventral lobe of pancreas; 14, upper and lower segments of small intestine; 15, ceca; 16, large intestine or rectum; 17, cloaca.

Figura 10. Anatomia del sistema digestiu del pollastre. Imatge extreta del web <http://chla.library.cornell.edu/t/text/gifcvtdir/2801458/00000177.tifs.gif>.

Els segments intestinals, lliures de teixit mesentèric, es submergeixen en sèrum fisiològic fred (NaCl 9 g/L, 4°C) i s'everteixen amb l'ajut d'una cànula, de manera que quedi la mucosa cap a la cara exterior i la serosa cap a la cara interior (**Figura 11**). Llavors, cada segment es talla en 3-4 porcions de 3 cm de llargària aproximadament. Cada porció, acuradament assecada amb un paper de filtre prèviament mullat amb sèrum fisiològic, es pesa (P1) i es lliga per un extrem amb un nus tancat i per l'altre, amb un nus obert que permeti la introducció d'una agulla de punta roma unida a una xeringa que conté medi serosal. Un cop ple, s'acaba de lligar bé el nus per acabar de formar el sac i es torna a pesar (P2). A continuació, s'introdueix en un erlenmeyer amb 15 mL de medi mucosal, borbollejat amb carbògen ($95\% \text{O}_2$ i $5\% \text{CO}_2$) durant 30 min en un bany termostàtic a 37°C . L'increment de pes (P2-P1) es pren com a mesura del volum serosal inicial introduït en cada sac.

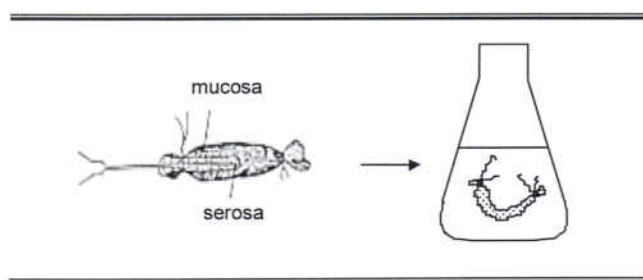


Figura 11. Esquema de l'emplenament d'un sac intestinal evertit.

Al final del període d'incubació, cada sac intestinal s'asseca i es pesa (P3). Acte seguit, es practica una incisió i s'extreu el contingut serosal. Aquest es centrifuga (16.000 g , 5 min) i el sobrenedant obtingut es congela a -80°C fins al moment de la seva quantificació. Cada sac intestinal buit es torna a pesar (P4) de manera que la diferència entre P3 i P4 és el volum romanent després del període d'incubació. A continuació, es procedeix a l'extracció del substrat acumulat en la paret intestinal per incubació de cada sac durant tota la nit amb 1 mL d' HNO_3 0,1 N, en agitació contínua. Al matí següent, es centrifuga (1.900 g , 5 min) i el sobrenedant obtingut es congela a -80°C fins el moment de la seva quantificació.

Els resultats de l'acumulació de monòmer en la paret intestinal es normalitzen pel pes del sac buit abans del període d'incubació (P1) i s'expressen com a $\text{nmol}/100 \text{ mg}$ de teixit. Els resultats de l'aparició de monòmer en el compartiment serosal es calculen a partir del volum romanent després del període d'incubació (P3-P4), es normalitzen pel pes del sac buit abans del període d'incubació (P1) i s'expressen com a $\text{nmol}/100 \text{ mg}$ de teixit. La concentració de substrat en el compartiment mucosal s'expressa com a mmol/L .

▪ **Composició del medis experimentals.** Per a la realització dels estudis de l'acumulació de substrat en la paret intestinal i aparició serosal en presència o absència de gradient de H^+ i/o gradient de Na^+ s'han utilitzat els següents medis experimentals:

→ **Medis experimentals amb Na^+ (Taula 5):**

- ⇒ **Medi Serosal 1:** solució Krebs-Henseleit amb $NaHCO_3/CO_2$ com amortidor de pH (pH 7,4)
- ⇒ **Medis Mucosals:** s'han assajat diferents medis mucosals que difereixen en el seu pH:
- **Medi Mucosal A:** solució Krebs-Henseleit amb $NaHCO_3/CO_2$ com amortidor de pH (pH 7,4), a la qual s'ha addicionat DL-HMB o DL-HMB-PCM a una concentració de 7 mmol/L
 - **Medi Mucosal B:** solució Krebs-Henseleit amb àcid 4-(morfolino)età-2-sulfònic (MES)/TRIS com amortidor de pH (pH 5,5), a la qual s'ha addicionat DL-HMB, DL-HMB-PCM o L-Met a una concentració de 7 mmol/L

Composició (mmol/L)	Medis experimentals amb Na^+		
	Serosal 1	Mucosal A	Mucosal B
NaCl	118	118	118
KCl	4,74	4,74	4,74
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,18	1,18	1,18
$CaCl_2$	1,27	1,27	1,27
KH_2PO_4	1,18	1,18	1,18
$NaHCO_3$	25	25	-
MES	-	-	25
Substrat ^a	-	7	7
Carbògen (95% O_2 -5% CO_2) q.s.	pH 7,4	pH 7,4	-
TRIS 2 mmol/L q.s.	-	-	pH 5,5

Taula 5. Composició del medis experimentals que contenen Na^+ . ^aDL-HMB-PCM, DL-HMB o L-Met.

→ **Medis experimentals sense Na^+ (Taula 6):**

- ⇒ **Medi Serosal 2:** solució Krebs-Henseleit amb $KHCO_3/CO_2$ com amortidor de pH (pH 7,4)

⇒ **Medis Mucosals:** s'han assajat diferents medis mucosals que difereixen en el seu pH:

- **Medi Mucosal C:** solució Krebs-Henseleit amb $\text{KHCO}_3/\text{CO}_2$ com amortidor de pH (pH 7,4), a la qual s'ha addicionat DL-HMB o DL-HMB-PCM a una concentració de 7 mmol/L
- **Medi Mucosal D:** solució Krebs-Henseleit amb MES/TRIS com amortidor de pH (pH 5,5), a la qual s'ha addicionat DL-HMB o DL-HMB-PCM a una concentració de 7 mmol/L

Composició (mmol/L)	Medis experimentals sense Na^+		
	Serosal 2	Mucosal C	Mucosal D
KCl	123	123	123
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,18	1,18	1,18
CaCl_2	1,27	1,27	1,27
KH_2PO_4	1,18	1,18	1,18
KHCO_3	25	25	-
MES	-	-	25
Substrat ^a	-	7	7
Carbògen (95% O_2 -5% CO_2) q.s.	pH 7,4	pH 7,4	-
TRIS 2 mmol/L q.s.	-	-	pH 5,5

Taula 6. Composició del medis experimentals sense Na^+ . ^aDL-HMB-PCM, DL-HMB.

El medi serosal i els medis mucosals necessaris es preparen el mateix dia de l'experiment i, un cop ajustat el pH, es comprova que l'osmolaritat sigui al voltant de 300 mOsm/L. De manera preliminar, es va comprovar que el pH del medis experimentals descrits es mantenia constant durant el transcurs dels 30 min d'incubació.

3.1.6. Quantificació del monòmer del DL-HMB-PCM i del DL-HMB per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

▪ **Fonament.** La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) és actualment una de les tècniques analítiques de separació més àmpliament utilitzada en molts camps científics i tècnics per la seva versatilitat i ampli camp d'aplicació. Es basa en les forces que estableix una fase mòbil de naturalesa líquida en forçar-la a travessar, gràcies a l'aplicació d'altres pressions, per una columna cromatogràfica que conté una fase estacionària en el seu

interior. Així doncs, es produeix una competència entre la tendència que té la fase mòbil a solubilitzar el solut i la força de retenció per part de la fase estacionària. Dependent de les característiques d'ambdues fases i també del propi solut, es produirà un procés de migració diferencial dels components de la barreja i, com a conseqüència, la seva separació en funció del temps de retenció a la columna. A la sortida de la columna, hi ha un detector que analitza qualitativament i quantitativa cada fracció amb una tècnica adient, sigui fluorimètrica, electroquímica, o altres.

▪ **Protocol experimental.** Les mostres obtingudes han estat processades per quantificar el contingut de monòmer del DL-HMB-PCM i DL-HMB de cada una de les mostres segons el protocol (referència Z 030-E04) establert per Adisseo S.A.S. (Antony, França). Aquestes anàlisis s'han dut a terme en el Servei de Cromatografia de líquids i electroforesi capil·lar dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

- **Preparació de les mostres i de la recta patró.** Cada mostra es passa a través d'un filtre de membrana de niló de 0,45 µm (Millex-HV, Millipore, Madrid) per poder ésser injectades al sistema d'HPLC. A més, es preparen unes solucions patró amb la sal de Ca^{2+} del DL-HMB per obtenir una recta patró de rang de concentracions de 0,2 fins 10 mmol/L, que també són degudament filtrades i injectades al sistema.
- **Condicions de l'anàlisi cromatogràfica.** Els patrons i les mostres obtingudes s'injecten a un sistema d'HPLC Waters 2690 (Alliance Waters Chromatography, Milford, MA, E.U.A) equipat amb una columna Insertil ODS2 de 250 x 4,6 mm de llargària i diàmetre intern, respectivament (G.L.Sciences, Tokyo, Japó) empaquetada per Surgelabor S.A. (Madrid) i protegida per un protector de columnes ODS (G.L.Sciences, Tokyo, Japó). La fase mòbil consisteix en una barreja (8:92, v/v) d'acetonitril i aigua acidificada a pH 2,0 amb H_3PO_4 concentrat. S'injecten 20 µL de cada patró i mostra a un flux de fase mòbil de 0,8 mL/min a 45°C durant 45 min (Column oven 480, Bio-Tek Instruments, Cornate d'Adda, Itàlia). Es mesura l'absorbància a 214 nm (detector Kontron 432, Bio-Tek Instruments, Cornate d'Adda, Itàlia) de manera que el sistema integra l'àrea del pic d'absorbància (integrador de dades Millenium 32, Waters Chromatography, Milford, MA, E.U.A). Aquest valor d'àrea s'interpol·la a la recta patró obtinguda per extreure la concentració de monòmer en cada mostra injectada.

3.1.7. Hidròlisi alcalina dels oligòmers del DL-HMB

▪ **Protocol experimental.** Per tal de determinar la capacitat de l'intestí per hidrolitzar els oligòmers presents en el DL-HMB s'ha seguit el protocol esquematitzat en la **Figura 12**. Per fer els càlculs, s'ha assumit que les formes no-monomèriques susceptibles d'hidròlisi són només els dímers. La concentració de dímers hidrolitzats es calcula a partir de la diferència en la concentració de monòmer abans i després de la hidròlisi alcalina de les mostres. Aquesta hidròlisi alcalina s'ha portat a terme adaptant el protocol descrit per Ontiveros *et al.* (1987). A un volum de mostra de 500 µL, s'addicionen 60 µL de KOH al 50% i s'agita durant 1 min. Llavors, s'afegeixen 60 µL d'HCl al 80% (v/v) i s'agita novament durant 30 s. Les mostres obtingudes es centrifuguen (10.000 g, 10 min) i es fan passar a través d'un filtre de membrana de niló de 0,22 µm (Millex-HV, Millipore, Madrid) per poder ésser injectades al sistema d'HPLC. El rendiment calculat per aquest procés ha estat de $95,3 \pm 1,5$ % ($n = 25$). La hidròlisi intestinal s'expressa com el tant per cent dels dímers hidrolitzats respecte la concentració inicial de dímers en el medi mucosal.

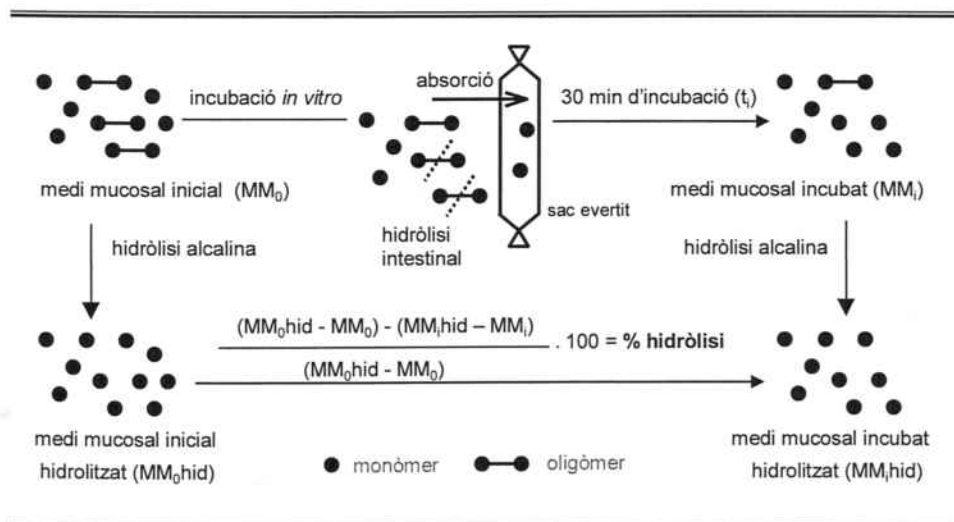


Figura 12. Disseny experimental per al càlcul de la hidròlisi intestinal dels oligòmers. La concentració de dímers es calcula a partir de la diferència en la concentració de monòmer abans i després de la hidròlisi alcalina de les mostres. La hidròlisi dels dímers s'expressa com el tant per cent dels dímers hidrolitzats (per diferència entre la concentració de dímers abans i després de la incubació) respecte la concentració inicial de dímers en el medi mucosal.

3.1.8. Quantificació de Met, Cys, Tau i altres aminoàcids per cromatografia de bescanvi iònic

▪ **Fonament.** La cromatografia de bescanvi iònic és una tècnica molt utilitzada per a l'estudi quantitatiu dels aminoàcids lliures en mostres biològiques. Es tracta d'una cromatografia líquida en què la fase estacionària és una resina amb grups funcionals iònics carregats negativament. Aquesta tècnica consisteix en col·locar en una columna de resina de poliestirè sulfonada (intercanviador catiònic) una barreja d'aminoàcids a pH 3 que els confereix càrrega positiva, de manera que són retinguts per la fase estacionària. Acte seguit, es fa passar per la columna una solució amortidora de pH i força iònica creixent que neutralitza la càrrega positiva dels aminoàcids, fent que l'atracció iònica entre la resina i l'aminoàcid es perdi. En aquestes condicions, i segons sigui la seva naturalesa química, cada aminoàcid elueix per la columna a un temps característic, aconseguint-se així la separació. Una reacció postcolumna amb ninhidrina, que actua com a oxidant potent que desamina i descarboxila els aminoàcids, forma compostos blau-violeta (púrpura de Ruheman) amb un pic d'absorbància a 570 nm i 440 nm per a la majoria dels aminoàcids i iminoàcids, respectivament.

▪ **Protocol experimental.** Les mostres obtingudes han estat processades per quantificar el contingut en aminoàcids lliures. Aquestes anàlisis s'han dut a terme en el Servei d'Anàlisi elemental orgànica i d'aminoàcids dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

- **Preparació de mostres.** Es prenen 250 µL de contingut serosal, es dilueixen amb 750 µL d'aigua i s'afegeix 25 µL de norleucina 2 mmol/L com a patró intern. Es pipetejen 400 µL de la barreja i es col·loquen en un tub eppendorf equipat amb un filtre Ultrafree® i es centrifuga a 13.000 g durant 15 min perquè es produeixi el procés de filtració. De la solució obtinguda, s'injecten 100 µL al sistema cromatogràfic.
- **Condicions de l'anàlisi cromatogràfica.** La separació cromatogràfica dels diferents aminoàcids lliures continguts en cada mostra es va realitzar seguint la metodologia descrita per Moore *et al.* (1958). L'analitzador (Amino Acid Analyser model Alpha Plus, Amersham Pharmacia LKB Biotech-Biochrom, Cambridge, Anglaterra) està equipat amb una columna de bescanvi iònic de 200 mm x 4 mm de llargària i diàmetre intern, respectivament (Biochrom, Cambridge, Anglaterra). L'anàlisi cromatogràfica es fa utilitzant una solució amortidora de citrat de liti, de pH i força iònica creixent al llarg del programa. Cada mostra es fa reaccionar, en flux continu de solució amortidora i a una

temperatura de 135°C, amb ninhidrina. La identificació dels diferents aminoàcids s'ha dut a terme segons el seu temps de retenció, comparant aquest valor amb l'obtingut a partir d'una solució estàndard d'aminoàcids de composició coneguda, eluïda en les mateixes condicions que la mostra. La quantificació dels aminoàcids de les mostres es realitza per comparació de les àrees dels pics obtingudes respecte a les àrees de la solució estàndard de concentració coneguda.

3.1.9. Anàlisi estadística

Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ error estàndard (ES). Totes les dades s'han comparat utilitzant l'anàlisi de la variància (ANOVA) que disposa el paquet estadístic SPSS® 10.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, E.U.A). La prova estadística de comparació utilitzada ha estat la F d'Snedecor, amb un nivell de significació de 0,05. Quan la comparació ha estat significativa s'ha aplicat el test paramètric de la t d'Student per establir diferències estadísticament significatives entre mitjanes. En tots els casos, un valor de $P < 0,05$ denota diferència estadísticament significativa.

3.2. Estudis en cèl·lules intestinals Caco-2

3.2.1. Materials

Les cèl·lules Caco-2 han estat cedides pel Dr. David Thwaites (Department of Physiological Sciences, University of Newcastle upon Tyne, Anglaterra). El DL-HMB (Rhodimet™ AT88) ha estat cedit per Adisseo France, S.A.S (Antony, França). El medi de cultiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), així com la tripsina, la penicil·lina i l'estreptomicina són de Gibco (Paisley, Escòcia). El líquid de centelleig (Filtron-X) és de National Diagnostics (Hessle, Anglaterra). El sèrum fetal boví i la solució salina amortidora de fosfats estèril (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D-PBS, pH 7,3) així com la resta de reactius procedeixen de Sigma (St. Louis, MO, E.U.A). El material estèril per al cultiu cel·lular prové de Costar (Cambridge, MA, E.U.A) i les cambres Fast-Read® per al recompte de cèl·lules són de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanya).

L'àcid DL-[1-¹⁴C]-2-hidroxi-4-metiltiobutanoic (activitat específica, 55 mCi/mmol), la L-[1-¹⁴C]-metionina (activitat específica, 55 mCi/mmol), la D-[1-¹⁴C]-metionina (activitat

específica, 55 mCi/mmol), el D-[2-³H]-mannitol (activitat específica, 30 Ci/mmol/L) i la [1,2-¹⁴C]-taurina (activitat específica, 110 mCi/mmol) procedeixen d'ARC (St. Louis, MO, E.U.A.).

3.2.2. Cultiu cel·lular

Per a la realització dels experiments s'han utilitzat cèl·lules intestinals Caco-2 entre els passatges 105 i 125, cultivades tot seguint el procediment descrit per Thwaites *et al.* (1993b). Els cultius es mantenen en una estufa (Jouan IG150, Evry, França) a 37°C en atmosfera d'aire modificada amb un 5% de CO₂. La manipulació s'ha portat a terme en condicions d'esterilitat, treballant en una campana de flux laminar vertical prèviament polvoritzada amb etanol al 70% i tractada amb llum ultraviolada durant 20 min.

El cultiu es fa créixer de forma rutinària en flascons fins assolir el 70-80% de confluència, aproximadament una setmana després de la sembra. En aquest moment, es procedeix a la tripsinització per tal de ressemar el cultiu amb finalitats experimentals o d'ampliació d'aquest.

3.2.3. Composició dels medis de cultiu

S'han utilitzat diferents medis de cultiu, la composició dels quals s'indica a continuació:

- ➔ **Medi Control:** DMEM amb 4,5 g/L de D-glucosa i 2 mmol/L de L-glutamina, complementat amb 1% (v/v) d'aminoàcids no essencials, 10% (v/v) de sèrum fetal boví inactivat per calor, 100 UI/mL de penicil·lina i 100 µg/mL d'estreptomicina. Aquest medi conté 0,2 mmol/L de L-Cys i 0,2 mmol/L de L-Met.
- ➔ **Medi sense L-Met (0 mmol/L):** DMEM amb 4,5 g/L de D-glucosa i 2 mmol/L de L-glutamina i que no conté ni L-Met ni L-Cys en la seva composició. Aquest medi es complementa amb 1% (v/v) d'aminoàcids no essencials, 10% (v/v) de sèrum fetal boví inactivat per calor, 100 UI/mL de penicil·lina i 100 µg/mL d'estreptomicina. A més, a aquest medi se li addiciona 0,2 mmol/L de L-Cys i, segons el disseny experimental, una concentració determinada de L-Met, DL-Met o DL-HMB com a font de Met. Tenint en compte que tant la L-Cys com les diferents fonts de Met utilitzades no compleixen el requisit d'esterilitat, els medis complementats es passen a través

d'un filtre de 0,22 μm de diàmetre de porus. Prèviament, s'ha comprovat que el pH del medi no s'altera per l'addició de les diferents fonts de Met.

3.2.4. Tripsinització

- **Fonament.** Les cèl·lules, mantingudes en les condicions adients, s'adhereixen a la superfície d'un suport formant, així, una matriu d'unió. La tripsinització, o tractament amb tripsina, permet la disgregació enzimàtica d'aquestes unions així com de les unions intercel·lulars, obtenint-se una suspensió de cèl·lules. La presència d'EDTA en la solució de tripsina optimitza el procés de disgregació ja que actua com a quelant de metalls que podrien inhibir l'activitat de l'enzim. Un cop transcorregut el temps d'incubació, i per tal de no comprometre la viabilitat cel·lular, la tripsina s'inactiva per addició de medi de cultiu amb sèrum. Cada cop que es tripsinitza s'obté un passatge cel·lular nou que s'identifica amb un número correlatiu respecte al passatge anterior.

- **Protocol experimental.** El cultiu es renta dues vegades amb D-PBS i s'incuba a 37°C durant 15 minuts aproximadament amb 0,25% de tripsina dissolta en D-PBS lliure de Ca^{2+} i Mg^{2+} i que conté 0,2 g/L EDTA. S'utilitza un volum de 30-50 μL de tripsina per cm^2 de superfície a tractar. Passat el temps d'incubació, es comprova que les cèl·lules s'hagin després de la superfície de creixement i, a continuació, es procedeix a la inactivació de la tripsina per addició de medi de cultiu (3 vegades el volum de tripsina utilitzat).

3.2.5. Recompte de cèl·lules viables

- **Fonament.** Els agents intercalants, com els fluorocroms taronja d'acridina i bromur d'etidi, són molècules planes i hidròfobes que s'insereixen entre parells de bases de l'ADN provocant distorsions de la doble hèlix. Quan s'uneixen a l'ADN, aquests fluorocroms emeten fluorescència. El taronja d'acridina és un colorant que entra dins les cèl·lules vives i tenyeix de color verd l'ADN bicatenari i de color taronja clar l'ADN monocatenari i l'ARN. El bromur d'etidi, en canvi, únicament traspasa la membrana plasmàtica de les cèl·lules mortes i tenyeix de taronja vermellós intens el seu material genètic (Parks *et al.*, 1979).

- **Preparació del colorant.** Es prepara una dilució 1:100 de taronja d'acridina i una dilució 1:20 de bromur d'etidi. Es barregen ambdós colorants a la mateixa proporció (dilució

1:1), la solució resultant es torna a diluir 10 vegades (solució de treball) i es guarda a 4°C en un recipient de vidre topazi. Totes les dissolucions esmentades es preparen amb D-PBS.

▪ **Protocol experimental.** Es barregen 100 µL de suspensió cel·lular amb 500 µL de medi DMEM per tal de diluir la mostra. D'aquesta suspensió, es prenen 50 µL i es barregen amb 50 µL de la solució de treball del colorant i s'emplenen les cel·les necessàries d'una cambra Fast-Read® per procedir al recompte de les cèl·lules per microscòpia de fluorescència. Tenint en compte que el volum de l'interior de cada cel·la és d'1 µL, es calcula el número de cèl·lules viables/µL de suspensió cel·lular inicial.

3.2.6. Ressebra del cultiu

▪ **Protocol experimental.** A partir del número de cèl·lules viables/µL de suspensió cel·lular inicial i de la densitat de sembra desitjada, es barreja el volum de suspensió cel·lular amb medi de cultiu fins a completar el volum adient que varia segons el recipient de cultiu utilitzat:

⇒ **Flascons.** Recipients de cultiu de poliestirè amb una superfície de creixement de 25, 75 o 150 cm² tractada per facilitar l'adhesió de les cèl·lules (**Figura 13**). Els cultius es sembren a una densitat de 50.000 cèl·lules/cm². El volum final de medi de cultiu és de 10, 20 o 30 mL per als flascons de 25, 75 o 150 cm² de superfície de creixement, respectivament. El medi de cultiu es canvia dos cops per setmana i el dia abans de l'experiment.

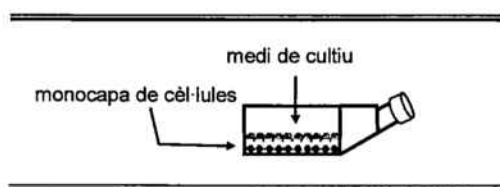


Figura 13. Esquema del cultiu en flascons.

⇒ **Clusters o plaques.** Recipients de cultiu de poliestirè amb superfície de creixement tractada per facilitar l'adhesió de les cèl·lules (**Figura 14**). Cada placa consta de 6 pous amb una superfície de creixement de 9,5 cm². Els cultius es sembren a una densitat de 50.000 cèl·lules/cm². El volum final de medi de cultiu és de 5 mL. El medi de cultiu es canvia dos cops per setmana i el dia abans de l'experiment.

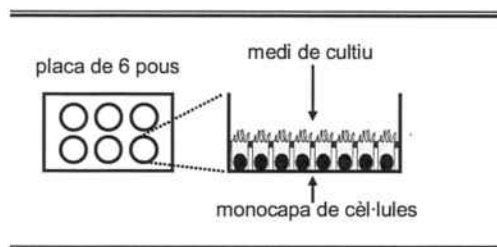


Figura 14. Esquema del cultiu en plaques.

⇒ **Transwells® o filtres.** Recipients de cultiu formats per una placa de 12 pous amb un suport permeable o filtre de policarbonat tractada per facilitar l'adhesió de les cèl·lules, amb una superfície de creixement d' $1,1 \text{ cm}^2$ (Figura 15). Els cultius es sembren a una densitat de $400.000 \text{ cèl·lules/cm}^2$. Aquests recipients estan indicats per estudiar el transport, ja que les cèl·lules creixen sobre un filtre que permet la discriminació de dos compartiments, l'apical i el basolateral. El volum final de medi de cultiu és de $700 \mu\text{L}$ i $1,5 \text{ mL}$ en el compartiment apical i basolateral, respectivament. El medi de cultiu es canvia tres cops per setmana i el dia abans de l'experiment.

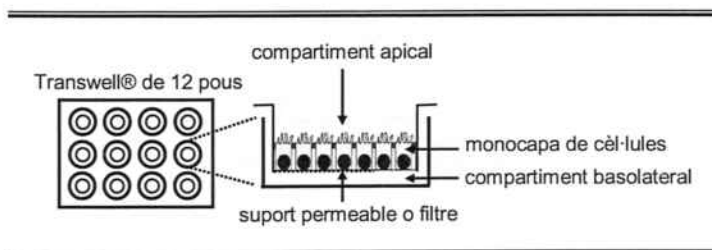


Figura 15. Esquema del cultiu en filtres.

3.2.7. Determinació de l'activitat sacarasa

▪ **Fonament.** L'activitat de l'enzim sacarasa constitueix un bon marcador de la diferenciació cel·lular ja que incrementa a mida que les cèl·lules es van diferenciant (Hidalgo *et al.*, 1989). Per a la determinació de l'activitat sacarasa s'ha seguit el mètode descrit per Dahlqvist (1964) que consta de dues fases, esquematitzades a la Figura 16. La primera fase consisteix en incubar durant 30 min la mostra problema amb una solució amortidora de fosfats que conté sacarosa. En aquest temps, la sacarosa es transforma per acció de l'enzim sacarasa present a la mostra problema en glucosa i fructosa. La segona fase consisteix en

bloquejar la reacció per addició d'una solució (Glucostat) que conté glucosa oxidasa i peroxidasa. La glucosa oxidasa transforma la glucosa obtinguda en la primera fase en àcid glucònic i H_2O_2 . La peroxidasa catalitza la reacció del H_2O_2 amb la 4-aminoantipirina per donar lloc a un complex colorejat amb una absorbància característica a 505 nm.

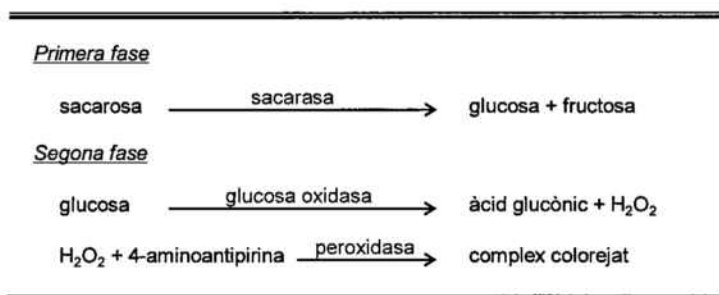


Figura 16. Esquema de la determinació de l'activitat sacarasa.

▪ **Composició dels reactius.** S'han utilitzat dos reactius, la composició dels quals s'indica a continuació (Taula 7):

Solució amortidora de fosfats	
KH_2PO_4	0,05 mol/L
K_2HPO_4	0,05 mol/L
NaN_3	3 mmol/L
Glucostat	
TRIS	0,5 mmol/L
àcid p-hidroxibenzòic	10 mmol/L
4-aminoantipirina	0,4 mmol/L
glucosa oxidasa	1480 UI/L
peroxidasa	250 UI/L
HCl q.s.p	pH 7,3

Taula 7. Composició dels reactius utilitzats en la determinació de l'activitat sacarasa.

▪ **Protocol experimental.** La preparació de les mostres i de la recta patró per determinar l'activitat sacarasa s'indica a continuació:

- **Preparació de mostres.** Es dilueixen 100 μL de la suspensió cel·lular amb 100 μL de la solució amortidora de fosfats i s'homogeneïtza a 4°C utilitzant un vas de vidre amb pistil de tefló. A continuació, es barregen 150 μL de la solució amortidora de fosfats amb 50

μL d'una solució de sacarosa 0,1 mmol/L. Seguidament, s'afegeixen 50 μL de la suspensió de cèl·lules homogeneïtzada i s'incuba 30 min a 37°C.

- **Preparació de la recta patró.** Es barregen 150 μL de solució amortidora de fosfats amb 12,5 - 25 - 50 - 100 i 200 μL d'una solució de glucosa 2 mmol/L, s'afegeix la quantitat necessària d'aigua fins a un volum final de 250 μL i s'incuba 30 min a 37°C.

Passat aquest temps, s'afegeix 1 mL de Glucostat i es torna a incubar durant 2 h a 37°C. Finalment, es mesuren les absorbàncies a 505 nm (espectrofotòmetre Shimadzu UV-160 A, Kyoto, Japó) i els resultats s'expressen en nmol de glucosa transformada per minut (mUI) i per mg de proteïna (mUI/mg proteïna).

3.2.8. Determinació de la concentració de proteïnes

- **Fonament.** S'ha quantificat la concentració de proteïnes seguint el mètode descrit per Bradford (1976), utilitzant el reactiu Bio-Rad. Aquesta tècnica es basa en l'addició d'un colorant de naturalesa àcida (Coomassie Brilliant Blue G-250) que reacciona amb les proteïnes, formant complexos colorimètrics relativament estables amb el pic d'absorbància a 595 nm. Mitjançant una recta patró amb albúmina sèrica bovina (BSA), es calcula la concentració proteica de la mostra.

- **Preparació dels reactius.** Per tal de preparar el colorant, es dilueix un volum de Bio-Rad concentrat amb quatre volums d'aigua i es passa a través d'un paper de filtre Whatman n.1 per eliminar impureses. A més, a partir d'una solució mare de BSA, es preparen cinc solucions estàndard (75 - 150 - 300 - 500 i 750 $\mu\text{g/mL}$).

- **Protocol experimental.** La preparació de la mostra varia segons si les cèl·lules han crescut en flascons o plaques, o bé en filtres. Per determinar la concentració de proteïnes de cultius crescuts en flascons o plaques, es dilueixen 100 μL de la suspensió cel·lular obtinguda després de la tripsinització amb 900 μL de D-PBS i s'homogeneïtza a 4°C utilitzant un vas de vidre amb pistil de tefló. Per determinar la concentració de proteïnes de cultius crescuts en filtres, la mostra s'obté per incubació del filtre durant 12 h amb 750 μL de NaOH 0,5 N. A cada mostra (50 μL) i a cada solució estàndard (50 μL) s'addicionen 50 μL d'àcid fòrmic i s'agita. Finalment, s'afegeix 1,5 mL del colorant preparat, s'agita i es procedeix a la lectura a l'espectrofotòmetre a 595 nm (Shimadzu UV-160 A, Kyoto, Japó). Els resultats s'expressen com a $\mu\text{g prot/cm}^2$ de superfície de creixement.



3.2.9. Composició dels medis de Krebs

Per a la realització dels estudis de permeabilitat paracel·lular i de transport en filtres, cal incubar les cèl·lules en un medi apical (que contingui el substrat) i en un medi basolateral, amb les característiques iòniques i de pH adients per poder assolir els objectius plantejats. Així doncs, s'han utilitzat diferents medis de Krebs segons si es requeria la presència o l'absència d'un gradient de H^+ i/o gradient de Na^+ (Thwaites *et al.*, 1993b). La composició dels medis és la següent:

→ Medis experimentals amb Na^+ (Taula 8):

- ⇒ **Medis Apicals:** s'han assajat diferents medis apicals que difereixen en el seu pH:
- **Medi Apical A:** solució Krebs amb HEPES/TRIS com amortidor de pH (pH 7,4)
 - **Medi Apical B:** solució Krebs amb MES/TRIS com amortidor de pH (pH 5,5)
- ⇒ **Medi Basolateral 1:** solució Krebs amb HEPES/TRIS com amortidor de pH (pH 7,4), és a dir, mateixa composició que el medi apical A

Composició (mmol/L)	Medis experimentals amb Na^+		
	Apical A	Apical B	Basolateral 1
NaCl	137	137	137
KCl	5,4	5,4	5,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0	1,0	1,0
CaCl ₂	2,8	2,8	2,8
NaH ₂ PO ₄	0,3	0,3	0,3
KH ₂ PO ₄	0,3	0,3	0,3
D-glucosa	10	10	10
HEPES	10	-	10
MES	-	10	-
TRIS 2 mmol/L q.s.p	pH 7,4	pH 5,5	pH 7,4

Taula 8. Composició dels medis de Krebs que contenen Na^+ .

→ Medis experimentals sense Na^+ (Taula 9):

- ⇒ **Medis Apicals:** s'han assajat diferents medis apicals que difereixen en el seu pH:
- **Medi Apical C:** Solució Krebs amb HEPES/TRIS com amortidor de pH (pH 7,4)
 - **Medi Apical D:** Solució Krebs amb MES/TRIS com amortidor de pH (pH 5,5)

⇒ **Medi Basolateral 2:** Solució Krebs amb HEPES/TRIS com amortidor de pH (pH 7,4), és a dir, mateixa composició que el medi apical C

Composició (mmol/L)	Medis experimentals sense Na ⁺		
	Apical C	Apical D	Basolateral 2
Clorur de colina (ChoCl)	137	137	137
KCl	5,4	5,4	5,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0	1,0	1,0
CaCl ₂	2,8	2,8	2,8
KH ₂ PO ₄	0,3	0,3	0,3
D-glucosa	10	10	10
HEPES	10	-	10
MES	-	10	-
TRIS 2 mmol/L q.s.p	pH 7,4	pH 5,5	pH 7,4

Taula 9. Composició dels medis de Krebs sense Na⁺.

3.2.10. Avaluació de la permeabilitat paracel·lular

La integritat de la monocapa de cèl·lules crescudes en filtres ha estat avaluada mitjançant la determinació de la Resistència Elèctrica Transepitelial (TEER) i dels fluxos unidireccionals de D-mannitol. Ambdues variables tenen una relació inversa entre elles, és a dir, uns valors de TEER elevats i uns fluxos de D-mannitol baixos fan referència a una permeabilitat paracel·lular reduïda i, per tant, a una bona integritat de l'epiteli.

3.2.10.1. Resistència elèctrica transepitelial (TEER)

▪ **Fonament.** La TEER és una mesura de la resistència que ofereix l'epiteli al flux paracel·lular d'ions. S'avalua per determinar la maduresa de la monocapa cel·lular ja que la TEER augmenta en funció de la presència de complexos d'unió intercel·lulars (Hidalgo *et al.*, 1989). La TEER s'ha determinat abans de cada experiment en cèl·lules crescudes en filtres per tal de confirmar la formació de la monocapa i de garantir una bona integritat de l'epiteli durant l'estudi.

▪ **Protocol experimental.** La TEER s'ha avaluat seguint la metodologia descrita per Hidalgo *et al.* (1989). El dia de l'experiment, és a dir als 19-21 dies després de la sembra, els filtres es renten tot submergint-los en medi de Krebs (pH 7,4) a temperatura ambient.

Seguidament, es col·loquen en una placa nova, situada damunt d'una placa calefactora a 37°C, i s'afegeix 1,5 mL i 0,7 mL de medi de Krebs (pH 7,4) en el compartiment basolateral i apical, respectivament. La TEER es determina utilitzant un voltímetre específic (Millicell-ERS, Millipore, Billerica, MA, E.U.A) que consta d'un parell d'elèctrodes en forma de pinça connectats a l'aparell de mesura. Així, l'extrem d'un elèctrode es submergeix en el medi basolateral i l'altre, en el medi apical (**Figura 17**), i es procedeix a la lectura de la resistència en Ohms (Ω). A aquest valor se li resta la lectura del filtre sense cèl·lules (blanc) i el resultat s'expressa com a $\Omega \cdot \text{cm}^2$ de superfície de creixement.

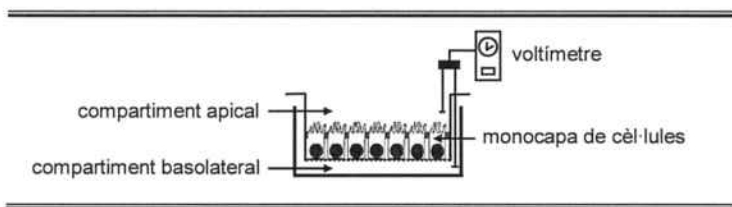


Figura 17. Esquema de la determinació de la TEER.

3.2.10.2. Fluxos unidireccionals de D-mannitol

- **Fonament.** El D-mannitol és un monosacàrid no metabolitzable, de baix pes molecular, que travessa l'epiteli intestinal únicament per la via paracel·lular. Els fluxos de D-mannitol són un bon indicador de la maduresa de l'epiteli atès que la presència dels complexos d'unió intercel·lulars els redueix notablement. Per tant, valors baixos d'aquesta variable posen de manifest un epiteli plenament diferenciat.

- **Protocol experimental.** Els fluxos unidireccionals de D-mannitol s'han avaluat d'acord amb la metodologia descrita per Thwaites *et al.* (1993b). Després de determinar la TEER, es canvia el medi apical pel mateix volum de medi de Krebs (pH 5,5) que conté 100 $\mu\text{mol/L}$ D-mannitol no radioactiu i 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ D-[2- ^3H]mannitol. Els filtres s'incuben durant 5 minuts a 37°C (**Figura 18**). Passat aquest temps, es prenen 0,7 mL de medi basolateral de cada pou i es dissolen en 4 mL de líquid de centelleig. Per tal de correlacionar les desintegracions per minut (dpm) que proporciona el comptador amb la quantitat de substrat que passa a través de la via paracel·lular, es preparen uns estàndards amb 10 μL de medi d'incubació amb el substrat radioactiu que es dissolen en 4 mL de líquid de centelleig. Les mostres i els estàndards es porten a comptar (comptador Packard 1500 Tri-Carb, Downers

Grove, IL, E.U.A) al Servei de Radioisòtops de la Facultat de Farmàcia. Els resultats s'expressen com a fmol/ μ g proteïna.

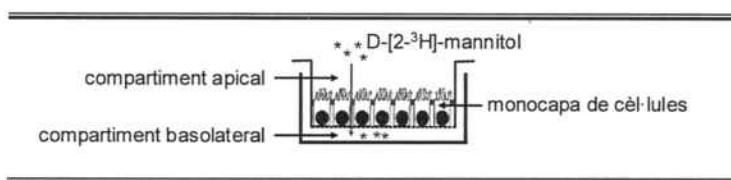


Figura 18. Esquema de la determinació dels fluxos unidireccionals de D-mannitol.

3.2.11. Transport a través de la membrana apical

- **Protocol experimental.** El transport a través de la membrana apical s'ha avaluat d'acord amb la metodologia descrita per Thwaites *et al.* (1993b). Després de determinar la TEER, es canvia el medi apical pel mateix volum del medi de Krebs adient que conté la concentració adequada de substrat no radioactiu i 0,2 μ Ci/mL de substrat radioactiu (Figura 19). Els filtres s'incuben a 37°C durant 5 min en la majoria d'experiments i en alguns casos durant 1 min. Passat aquest temps, els filtres es renten submergint-los, de manera seqüencial, en quatre vasos de precipitants que contenen 500 mL de medi de Krebs (pH 7,4) per tal d'eliminar les restes de producte radioactiu que no ha entrat dins la cèl·lula. Aquest procés de rentat es realitza a 4°C per tal d'aturar el transport i el metabolisme cel·lular. Seguidament, els filtres es separen del suport i es dissolen en 4 mL de líquid de centelleig. Per tal de correlacionar les dpm amb la quantitat de substrat que s'ha acumulat dins la cèl·lula, es preparen els estàndards de la mateixa manera que en l'apartat anterior. Les mostres i estàndards es porten a comptar (comptador Packard 1500 Tri-Carb, Downers Grove, IL, E.U.A) al Servei de Radioisòtops de la Facultat de Farmàcia. Els resultats s'expressen com a fmol - pmol/ μ g proteïna.

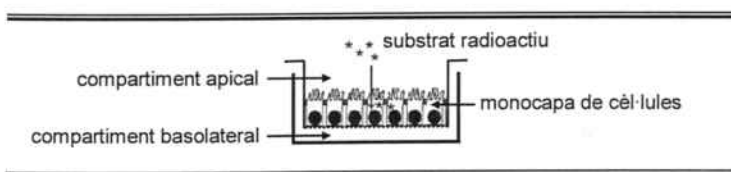


Figura 19. Esquema de la determinació del transport a través de la membrana apical.

3.2.12. Cinètica del transport

3.2.12.1. Anàlisi cinètica del transport apical

El càlcul de les constants cinètiques del transport s'ha realitzat per regressió no lineal ponderada utilitzant el programa Enzfitter (Biosoft, Cambridge, Anglaterra). Per tal de facilitar aquest ajust i estimar les diferents constants cinètiques de manera més fiable, a les dades obtingudes de transport s'ha restat els valors que corresponen a la difusió simple, determinada en presència d'un inhibidor del transport. S'ha provat d'ajustar cada corba cinètica a un model d'un o dos sistemes de transport i s'ha triat el millor ajust a partir de la menor suma dels quadrats de les distàncies dels punts experimentals a la corba de regressió no lineal (Motulsky i Ransnas, 1987).

3.2.12.2. Cinètica de Dixon

Per estudiar si la interacció de dos substrats amb un mateix transportador és de tipus competitiu, no-competitiu o acompetitiu, s'ha dut a terme la cinètica de Dixon. En aquests tipus d'experiments, s'estudia l'efecte de concentracions creixents d'inhibidor sobre el transport de diferents concentracions de substrat. Es tracta, aleshores, de linealitzar els resultats del transport, representant la inversa de la velocitat respecte a la concentració d'inhibidor. Les principals característiques dels tres tipus d'interacció són les següents:

- **Inhibició competitiva.** S'anomena inhibició competitiva si l'inhibidor interfereix en la unió del substrat a la proteïna transportadora, és a dir, si s'uneix al mateix *locus* del transportador, ja sigui transportat o no. La inhibició produïda depèn de les concentracions relatives del substrat i inhibidor i de la seva afinitat relativa. La inhibició està definida per una constant d'inhibició o K_i que indica la concentració a la qual l'inhibidor redueix a la meitat la V_{max} del substrat. Així doncs, el valor determinat experimentalment per la K_i del substrat, quan actua com a inhibidor, és similar al valor de la seva K_m . La presència d'un inhibidor de tipus competitiu no té cap efecte sobre la V_{max} del substrat, tot i que augmenta aparentment el seu valor de K_m . En una inhibició competitiva, la representació de Dixon mostra com totes les linealitzacions coincideixen en un punt fora de l'eix de les abscisses (**Figura 20**). La projecció sobre l'abscissa d'aquest punt d'encreuament determina la constant d'inhibició o K_i .

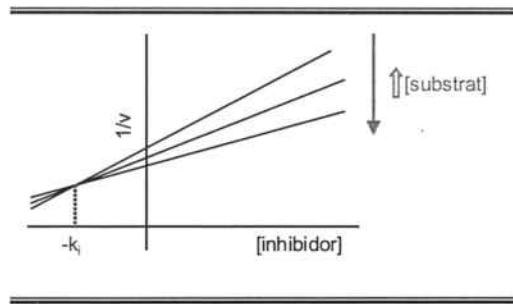


Figura 20. Representació de Dixon en una inhibició competitiva.

- **Inhibició no-competitiva.** S'anomena inhibició no-competitiva si l'inhibidor interfereix en una altra zona del transportador que no és el *locus* d'unió. La inhibició produïda no depèn de les concentracions relatives de substrat i inhibidor. Experimentalment, un inhibidor d'aquest tipus redueix la $V_{\max}$ del transportador per al substrat sense afectar el seu valor de K_m . En una inhibició no-competitiva, la representació de Dixon mostra com les linealitzacions coincideixen en un punt de l'eix de les abscisses (Figura 21).

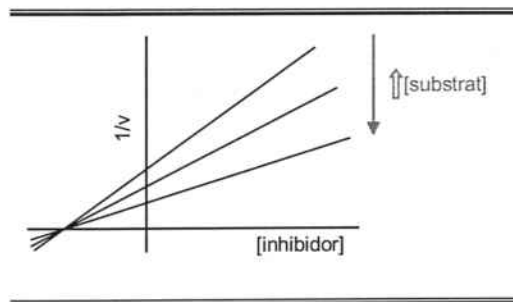


Figura 21. Representació de Dixon en una inhibició no-competitiva.

- **Inhibició acompetitiva.** S'anomena inhibició acompetitiva si l'inhibidor s'uneix al complex transportador-substrat, impedit la translocació. La presència d'un inhibidor d'aquest tipus redueix tant la $V_{\max}$ del substrat com el seu valor de K_m . En una inhibició acompetitiva, la representació de Dixon mostra que les linealitzacions no coincideixen en cap punt (Figura 22).

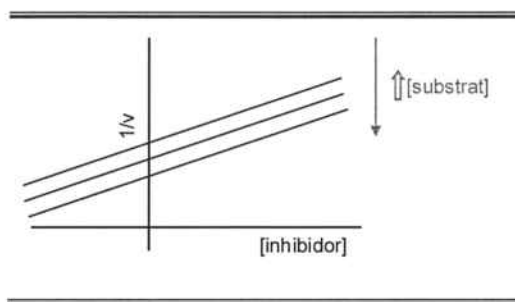


Figura 22. Representació de Dixon en una inhibició acompetitiva.

3.2.13. Purificació del DL-HMB radioactiu

S'ha descrit que el DL-HMB radioactiu conté impureses radioactives que podrien ésser quantificades com a DL-HMB (Esteve-Garcia i Austic, 1993). Per això, s'ha determinat la puresa del producte abans de la seva utilització i, en cas necessari, s'ha purificat per HPLC seguint el protocol descrit per Lawson i Ivey (1986).

- **Condicions cromatogràfiques.** S'injecta una mostra del producte radioactiu comercial a un equip d'HPLC (Waters 717 plus, Waters Chromatography, Milford, MA, E.U.A) equipat amb una columna Kromasil NH₂ (250 mm x 4,6 mm). La fase mòbil consisteix en un 77% (v/v) d'una solució 10 mmol/L d'àcid fosfòric ajustada a un pH de 3 amb NH₄OH concentrat i un 23% (v/v) d'acetonitril. El pic corresponent al monòmer del DL-HMB s'identifica amb una solució patró preparada a partir de la sal de Ca²⁺ del DL-HMB (**Figura 23**), es recull quan surt del sistema i s'evapora per eliminar l'acetonitril que conté. Finalment, es calcula els µCi/mL romanents en el producte purificat. L'anàlisi de la puresa del producte així com la seva purificació s'han dut a terme a la Unitat de Química Combinatòria de la Instal·lació Radioactiva del Parc Científic de la Universitat de Barcelona.

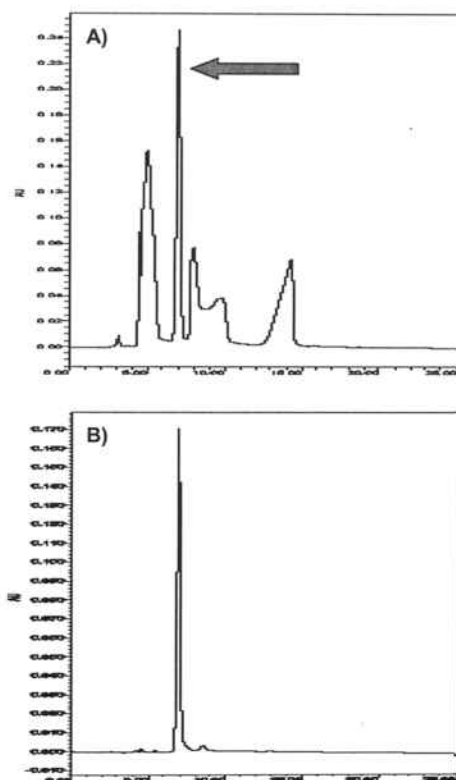


Figura 23. Cromatograma corresponent al DL-HMB radioactiu comercial (A) i a la sal de Ca^{2+} del DL-HMB (B). La fletxa assenyalava el pic del monòmer.

3.2.14. Incorporació de la radioactivitat a les proteïnes

La incorporació a la síntesi de proteïnes de la L-Met formada a partir del DL-HMB és una mesura indirecta de la capacitat de les cèl·lules per convertir i utilitzar l'hidroxianàleg en el metabolisme cel·lular.

- **Protocol experimental.** Després de la incubació dels filtres amb 100 $\mu\text{mol/L}$ de substrat no radioactiu i 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ de substrat radioactiu, tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.2.11., durant 5, 15, 30 i 60 min a 37°C, els filtres es renten submergint-los, de manera seqüencial, en quatre vasos de precipitants que contenen 500 mL de medi de Krebs (pH 7,4) a 4°C per tal d'eliminar les restes de producte radioactiu que no ha entrat dins la cèl·lula. Acte seguit, els filtres es retallen i s'incuben durant 1 h a 4°C en 500 μL 10% (v/v) àcid tricloroacètic (TCA) (Thwaites *et al.*, 1996). Passat aquest temps, la fracció insoluble o precipitable amb TCA, que representa la fracció que s'ha incorporat a les proteïnes, es

separa de la fracció soluble per centrifugació (15.000 g, 15 min, 4°C). Es pren una mostra de la fracció soluble (400 µL del sobrenedant) i de la fracció insoluble (el propi filtre) i es dissolen en 4 mL de líquid de centelleig. A més, s'agafen 0,7 mL de medi basolateral de cada pou i es dissolen en 4 mL de líquid de centelleig. Les mostres i estàndards preparats com en els experiments de transport apical es porten a comptar (comptador Packard 1500 Tri-Carb, Downers Grove, IL, E.U.A) al Servei de Radioisòtops de la Facultat de Farmàcia. Els resultats s'expressen com a percentatge de radioactivitat incorporada a les proteïnes respecte la suma de radioactivitat present en el medi basolateral, fracció soluble i filtre.

3.2.15. Determinació del pH intracel·lular (pH_i)

- **Fonament.** La 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceïna (BCECF) és un derivat de la fluoresceïna molt utilitzat com indicador fluorescent en la determinació del pH_i (Jackson i Halestrap, 1996) ja que la seva intensitat de fluorescència es redueix quan s'acidifica el pH_i. La tècnica es basa en determinar els canvis en l'excitació a 485 nm respecte a 440 nm, a una intensitat d'emissió de 535 nm. Per relacionar els canvis en la fluorescència amb el pH_i, es fa una corba patró amb cèl·lules tractades amb nigericina a diferents condicions de pH i en presència d'una concentració despolaritzant de K⁺. En aquestes condicions, s'equilibra el pH intern i extern (Thomas *et al.*, 1979).

- **Protocol experimental.** Després de determinar la TEER, es canvia el medi apical i basolateral per un medi de Krebs (pH 7,4) que conté 7,5 µmol/L BCECF i s'incuba durant 40 min a 37°C. Passat aquest temps, les cèl·lules es renten amb medi de Krebs (pH 7,4), es posen en una placa nova i s'afegeix medi de Krebs (pH 7,4) tant al medi apical com al basolateral. Acte seguit es mesura la fluorescència (fluorímetre Wallac 1420 VICTOR³™, PerkinElmer, Boston, MA, E.U.A) a una longitud d'ona d'emissió de 535 nm i a dues longituds d'ona d'excitació de 485 i de 440 nm. Cada 5 min, el medi apical es renova i es canvia la seva composició si així ho requereix el disseny experimental.

La recta patró obtinguda amb 10 µmol/L nigericina en presència de 110 mmol/L de K⁺, concentració intracel·lular determinada en cèl·lules Caco-2 (Osypiw *et al.*, 1994), demostra que la fluorescència mesurada és funció lineal del pH_i entre 5,5 i 7,5 (Figura 24).

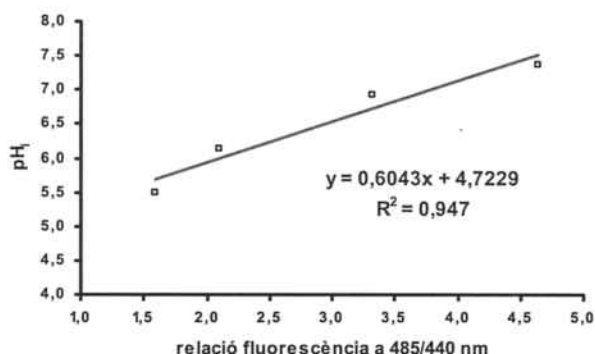


Figura 24. Relació lineal entre el pH i la fluorescència a 485/440 nm.

3.2.16. Determinació de l'activitat D-HADH

L'enzim D-HADH catalitza la primera etapa de la conversió del D-HMB en L-Met, és a dir, l'oxidació de D-HMB a KMB. S'ha descrit que aquest enzim està localitzat, entre altres teixits, a la mucosa intestinal (Knight i Dibner, 1984; Dupuis *et al.*, 1989).

- **Preparació i purificació de la mostra.** La preparació de les mostres s'ha realitzat seguint el el protocol descrit per Schreiner i Jones (1988). Per fer l'assaig es necessiten aproximadament 50 mg de proteïna, de manera que ha estat necessari acumular els cultius provinents de 18 flascons per a cada condició. Després de la tripsinització, la suspensió cel·lular obtinguda es centrifuga (12.000 g, 5 min, 4°C), es descarta el sobrenedant i el sediment cel·lular es resuspèn en 3 mL de solució amortidora de fosfats 50 mmol/L (pH 7,4) que conté 1 mmol/L clorhidrat de p-toluensulfonil. A continuació, s'homogeneïtza durant 2 minuts a 4°C utilitzant un vas de vidre amb pistil de tefló i es sonica durant 1 min a 3 A mantenint la mostra per sota dels 0°C. La mostra es dilueix fins a un volum de 5 mL amb solució amortidora de fosfats 50 mmol/L (pH 7,4) i es centrifuga (100.000 g, 75 min, 4°C). S'extreu el sobrenedant amb l'ajut d'una xeringa i es fa passar per una columna de 10 cm x 1,1 cm (Sephadex™ G-25M; Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suècia) equilibrada prèviament amb solució amortidora de fosfats 25 mmol/L (pH 6,3). Es recull la mostra que surt de la columna, es determina la concentració de proteïnes en una alíquota i es deixa 24 h a 4°C per activar l'enzim tal i com descriuen Tubbs i Greville (1961).

- **Protocol experimental.** L'assaig enzimàtic s'ha realitzat seguint el protocol descrit per Cammack (1969). S'addicionen 200 µL de la mostra purificada a 1 mL de solució d'assaig que conté 300 µmol/L TRIS-HCl (pH 8,6), 56 nmol/L 2,6-diclorofenolindofenol

(DCIP) i 40 $\mu\text{mol/L}$ D-lactat (sal de Li^+) i es fan mesures de l'absorbància cada 30 s durant 5 min a 600 nm i a 37°C (espectrofotòmetre Ultrospec 3000; Pharmacia Biotech, Cambridge, Anglaterra). La reacció que té lloc s'esquematitza en la **Figura 25**.

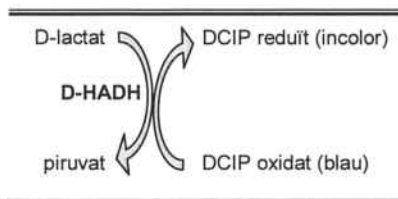


Figura 25. Reacció enzimàtica en la determinació de l'activitat D-HADH.

En la funció exponencial que s'obté en representar els canvis de l'absorbància al llarg del temps (**Figura 26**), l'exponent correspon als nmol de substrat oxidat per min, assumint que el DCIP té un coeficient d'extinció de $21.000 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$ a 600 nm (Armstrong, 1964). Tenint en compte que una unitat d'activitat de l'enzim es defineix com 1 nmol de substrat oxidat per min (mU), els resultats s'expressen com a mU/ μg proteïna.

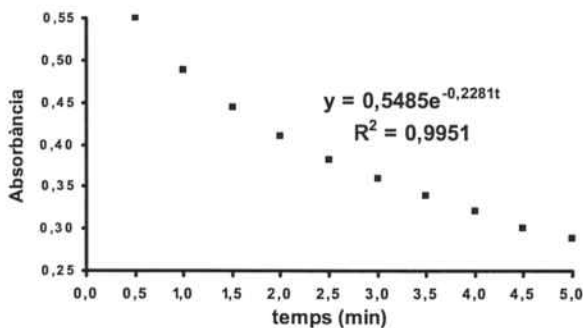


Figura 26. Exemple d'una corba obtinguda en representar l'absorbància al llarg del temps en la determinació de l'activitat D-HADH.

3.2.17. Anàlisi estadística

Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ error estàndard (ES). Totes les dades es comparen utilitzant l'anàlisi de la variància (ANOVA) que disposa el paquet estadístic SPSS® 10.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, E.U.A). La prova estadística de comparació utilitzada ha estat la F d'Snedecor, amb un nivell de significació de 0,05. Quan la comparació ha estat significativa s'ha aplicat el test paramètric de la t d'Student per establir diferències estadísticament significatives entre mitjanes. En tots els casos, un valor de $P < 0,05$ denota diferència estadísticament significativa.

4.1. Estudis a l'intestí de pollastre

Per determinar si la presència formes no-monomèriques és el factor limitant en l'absorció del DL-HMB, s'ha estimat la hidròlisi dels oligòmers per part de la mucosa intestinal i s'ha comparat el transport del DL-HMB amb un producte que només conté monòmer (DL-HMB-PCM), en condicions de presència i absència d'un gradient de H^+ i Na^+ . A més, s'ha examinat el perfil regional del transport del DL-HMB-PCM i s'ha comparat amb els resultats obtinguts per al DL-HMB.

4.1.1. Pes dels animals

S'ha determinat el pes dels animals el dia del sacrifici i els resultats (**Figura 27**) mostren que els pollastres alimentats amb dietes que contenen DL-HMB-PCM com a font de Met assoleixen un pes corporal similar a l'obtingut amb DL-HMB.

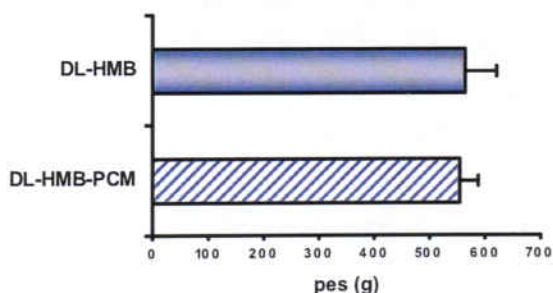


Figura 27. Pes dels animals el dia del sacrifici. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 26$ i 15 pollastres alimentats amb dietes que contenen DL-HMB-PCM i DL-HMB, respectivament. L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives entre substrats ($P > 0,05$).

4.1.2. Establiment de les condicions analítiques

En primer lloc, s'ha comprovat que les condicions cromatogràfiques establertes són les adequades per a la quantificació del monòmer de cada un dels substrats assajats. A títol d'exemple, es presenta una cromatograma (**Figura 28**) amb tres pics, sobreposats en un sol gràfic, corresponents a la quantificació del monòmer d'una solució de DL-HMB-PCM, DL-HMB i patró (DL-HMB- Ca^{2+}), on s'observa un temps de retenció similar en els tres casos, aproximadament als 12 min. En el cas del DL-HMB, si s'allarga el temps de l'anàlisi, el

cromatograma mostra també els pics corresponents a les formes no-monomèriques (entre els minuts 23 i 25), però, atès que només es pretenia quantificar el monòmer, el temps d'anàlisi s'ha limitat a 20 min.

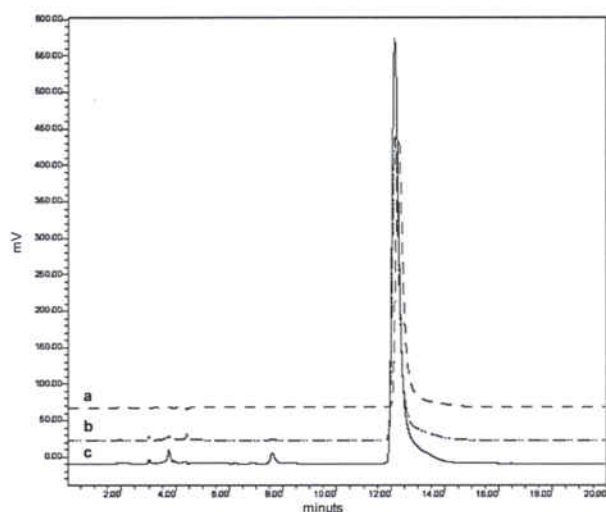


Figura 28. Cromatograma amb els pics, sobreposats en un sol gràfic, corresponents a: (a) medi mucosal 7 mmol/L DL-HMB-PCM; (b) medi mucosal 7 mmol/L DL-HMB i (c) solució patró 4,25 mmol/L de la sal de Ca^{2+} del DL-HMB, que correspon a una concentració de 8,5 mmol/L de DL-HMB.

4.1.3. Concentració de monòmer en el medi mucosal

En un treball anterior (Martín-Venegas *et al.*, 2006b), es va observar que l'absorció intestinal d'ambdós substrats en el jejú de pollastre en condicions *in vivo* mostrava un augment de monòmer en el medi perfundit amb DL-HMB a causa de la hidròlisi de les formes no-monomèriques durant la perfusió. Per aquesta raó, en aquest estudi s'ha analitzat la concentració de monòmer en el medi mucosal abans i després de 30 min d'incubació en sacs evertits de duodè, jejú i ili, a dos pH mucosals diferents (pHm 5,5 o 7,4) i mantenint el pH serosal a 7,4 (pHs 7,4). Els resultats obtinguts en presència (pHm 5,5 – pHs 7,4) i absència (pHm 7,4 – pHs 7,4) d'un gradient de H^+ es mostren a la **Figura 29**. Atès que només es quantifica el monòmer, la diferència detectada entre la concentració inicial de DL-HMB-PCM i DL-HMB correspon a les diferències en la composició de monòmer de cada producte calculada a partir de les especificacions del fabricant (**Taula 10**).

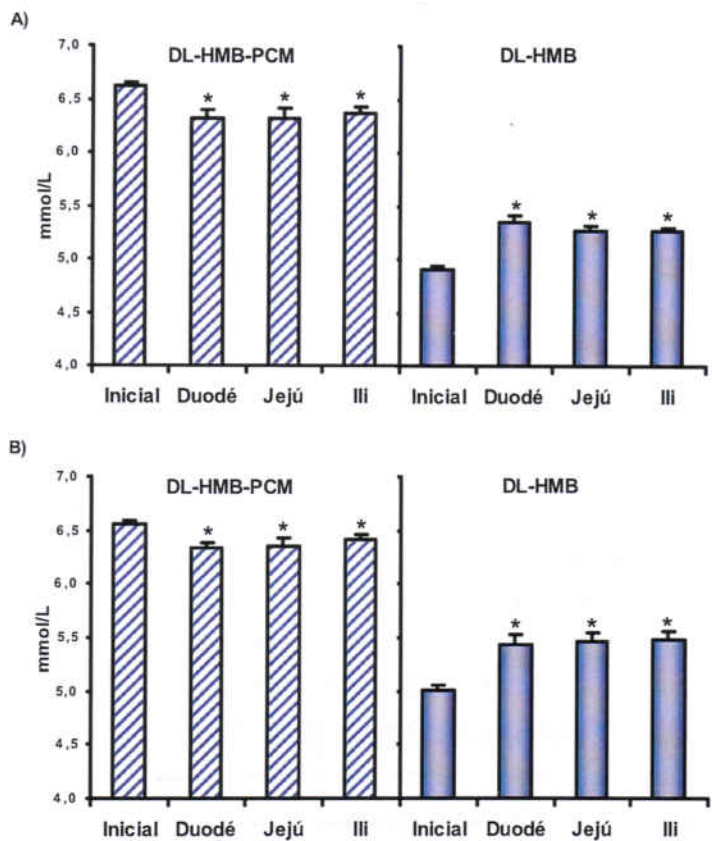


Figura 29. Concentració de monòmer en el medi mucosal de sacs evertits dels diferents segments intestinals abans (Inicial) i després de 30 min d'incubació amb 7 mmol/L DL-HMB-PCM o DL-HMB en presència (A) o absència (B) de gradient de H⁺. Els resultats s'expressen com a mitjana ± ES de n = 3-6 medis mucosals. *Diferències estadísticament significatives respecte la concentració inicial (P < 0,05).

Concentració 7 mmol/L	DL-HMB-PCM	DL-HMB
monòmer	6,7 mmol/L	5,3 mmol/L
dímer (expressat com a monòmer)	0,2 mmol/L	1,4 mmol/L
trímer (expressat com a monòmer)	0,1 mmol/L	0,3 mmol/L

Taula 10. Concentració de monòmer, dímer i trímer (expressat com a monòmer) en una solució 7 mmol/L DL-HMB-PCM i DL-HMB.

Per tal de determinar la precisió del mètode en la quantificació, s'ha comparat la concentració de monòmer obtinguda per HPLC amb la concentració teòrica de monòmer en cada cas. Els resultats indiquen que el medi mucosal conté un 96,8 ± 0,4 % (n = 9) i un 95,9

$\pm 1,0 \%$ ($n = 9$) de la concentració teòrica de monòmer del DL-HMB-PCM (6,7 mmol/L) i DL-HMB (5,3 mmol/L), respectivament. Un cop feta aquesta comprovació, els resultats de la concentració de monòmer després de la incubació mostren, en el cas del DL-HMB-PCM, una reducció significativa en els tres segments intestinals, indicatiu de la seva absorció. En canvi, la concentració de monòmer s'incrementa en els sacs incubats amb DL-HMB, suggerint doncs que es produeix la hidròlisi de les formes no-monomèriques durant la incubació.

4.1.4. Hidròlisi intestinal de les formes no-monomèriques del DL-HMB

Tenint en compte els resultats que suggereixen que la mucosa intestinal hidrolitza *in vitro* les formes no-monomèriques presents en el DL-HMB, s'ha calculat la capacitat hidrolítica de la mucosa intestinal. El percentatge de reducció de la concentració les formes dimèriques després de 30 min d'incubació en tots els segments intestinals (**Taula 11**) confirma la capacitat de la mucosa intestinal per hidrolitzar-les i explica l'augment de monòmer en el medi mucosal presentat a la Figura 29. A més, els resultats revelen que no hi ha diferències estadísticament significatives ni entre condicions de pH ni entre els tres segments intestinals.

Hidròlisi dels dímers (%)	pHm 5,5 – pHs 7,4	pHm 7,4 – pHs 7,4
Duodè	60,4 $\pm$ 2,5 (5)	58,8 $\pm$ 2,2 (4)
Jejú	51,7 $\pm$ 4,0 (10)	50,2 $\pm$ 4,1 (8)
Ili	50,2 $\pm$ 4,1 (10)	49,4 $\pm$ 3,3 (8)

Taula 11. Hidròlisi intestinal dels dímers després de 30 min d'incubació en els diferents segments intestinals en presència de 7 mmol/L DL-HMB en el medi mucosal i en presència (pHm 5,5 – pHs 7,4) o absència (pHm 7,4 – pHs 7,4) de gradient de H^+ . Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES (n entre parèntesi). L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives entre els diferents segments intestinals ni entre les diferents condicions de pH ($P > 0,05$).

4.1.5. Acumulació de monòmer en la paret intestinal

L'acumulació de monòmer en la paret intestinal s'ha comparat en presència (pHm 5,5 – pHs 7,4) i absència (pHm 7,4 – pHs 7,4) de gradient de H^+ . Els resultats (**Figura 30**) mostren que l'acumulació de monòmer en la paret intestinal és més elevada quan el pHm és de 5,5 en tots els segments intestinals i per a tots dos substrats, encara que aquesta diferència

només és estadísticament significativa en el jejú i l'ili. L'estudi regional indica que el duodè és el segment amb menor capacitat per acumular tant DL-HMB-PCM com DL-HMB als dos pH estudiats i no mostra diferències significatives entre el jejú i l'ili. L'estudi comparatiu mostra que en aquestes condicions experimentals no hi ha diferències significatives entre ambdós substrats en cap dels segments intestinals assajats.

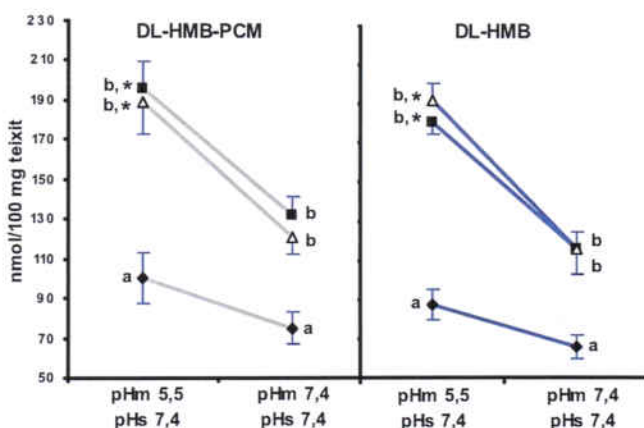


Figura 30. Acumulació de monòmer en la paret intestinal de sacs evertits incubats durant 30 min amb 7 mmol/L DL-HMB-PCM o DL-HMB, en presència (pHi 5,5 – pHs 7,4) o absència (pHi 7,4 – pHs 7,4) de gradient de H^+ , en el duodè (◆), jejú (■) i ili (Δ). pHi i pHs corresponen al pH del medi mucosal i serosal, respectivament. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 5-7$ sacs. *Diferències estadísticament significatives en l'acumulació de monòmer en presència o absència de gradient de H^+ ($P < 0,05$). Les mitjanes senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents per a cada condició de pH ($P < 0,05$). L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives entre substrats ($P > 0,05$).

Un cop confirmada la dependència del gradient de H^+ , s'ha estudiat la possible dependència del gradient de Na^+ en ambdues condicions de pH. Per fer-ho, s'ha determinat l'acumulació de monòmer en la paret intestinal utilitzant un medi d'incubació sense Na^+ i s'han comparat els valors obtinguts amb els presentats a la Figura 30. En presència de gradient de H^+ , els resultats (Taula 12) mostren que l'acumulació de monòmer d'ambdós substrats en la paret intestinal és més elevada en presència de Na^+ en tots els segments intestinals, encara que en el duodè aquesta diferència no presenta significació estadística. En canvi, en absència de gradient de H^+ s'observa que els resultats en absència de Na^+ no difereixen dels obtinguts en presència d'aquest ió en totes les condicions assajades. Així doncs, els resultats suggereixen que l'acumulació de monòmer en la paret intestinal és dependent del gradient de Na^+ només en presència de gradient de H^+ . El perfil regional és

similar al descrit en presència de Na^+ i, de nou, no hi ha diferències significatives entre ambdós substrats en cap dels segments intestinals assajats.

DL-HMB-PCM	pHm 5,5 – pHs 7,4		pHm 7,4 – pHs 7,4	
	presència Na^+	absència Na^+	presència Na^+	absència Na^+
Duodè	100,0 ± 12,8	70,7 ± 9,4	74,9 ± 8,0	71,2 ± 12,1
Jejú	195,7 ± 13,6	149,4 ± 11,6 *	132,2 ± 8,9	123,1 ± 13,7
Ili	189,4 ± 16,4	144,3 ± 5,0 *	120,5 ± 8,1	110,8 ± 12,6
DL-HMB	pHm 5,5 – pHs 7,4		pHm 7,4 – pHs 7,4	
	presència Na^+	absència Na^+	presència Na^+	absència Na^+
Duodè	87,2 ± 7,5	65,4 ± 13,1	65,9 ± 6,1	62,0 ± 6,1
Jejú	180,3 ± 5,8	133,3 ± 10,8 *	115,8 ± 12,7	119,9 ± 13,5
Ili	192,2 ± 8,7	144,9 ± 7,4 *	115,5 ± 9,3	99,5 ± 7,3

Taula 12. Acumulació de monòmer en la paret intestinal de sacs evertits incubats durant 30 min amb 7 mmol/L DL-HMB-PCM o DL-HMB, en presència (pHm 5,5 – pHs 7,4) o absència (pHm 7,4 – pHs 7,4) de gradient de H^+ i en presència o absència de Na^+ en el medi d'incubació. pHm i pHs corresponen al pH del medi mucosal i serosal, respectivament. Els resultats en presència de Na^+ corresponen als representats en la Figura 30. Els resultats s'expressen com a mitjana ± ES de n = 3 sacs en el cas dels valors obtinguts en absència de Na^+ . *Diferències estadísticament significatives en l'acumulació de monòmer en presència o absència de Na^+ per a un mateix substrat, condició de pH i segment intestinal ($P < 0,05$). L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives entre ambdós substrats ($P > 0,05$).

4.1.6. Aparició de monòmer en el medi serosal

L'aparició de monòmer en el medi serosal (**Figura 31**) després de la incubació amb DL-HMB-PCM i DL-HMB segueix un perfil similar a l'acumulació de monòmer en la paret intestinal però amb algunes diferències. Els resultats tornen a posar de manifest valors més elevats en presència de gradient de H^+ , encara que només és estadísticament significatiu en el jejú per al DL-HMB-PCM i en el jejú i l'ili per al DL-HMB. L'estudi regional indica que, per a ambdós substrats i condicions de pH, els valors més baixos corresponen al duodè, sense diferències significatives entre el jejú i l'ili, excepte per al DL-HMB-PCM en absència de gradient de H^+ on el jejú mostra valors significativament més elevats respecte l'ili. Si es comparen els resultats per ambdós substrats, les dades confirmen la manca de diferències, excepte en absència de gradient de H^+ on el DL-HMB-PCM pren valors significativament més elevats en el jejú.

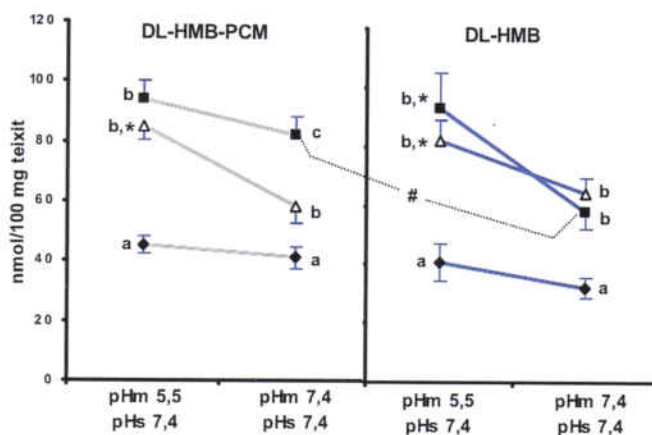


Figura 31. Aparició de monòmer en el medi serosal de sacs evertits incubats durant 30 min amb 7 mmol/L DL-HMB-PCM o DL-HMB, en presència (pHm 5,5 – pHs 7,4) o absència (pHm 7,4 – pHs 7,4) de gradient de H^+ , en el duodè (♦), jejú (■) i ili (Δ). pHm i pHs corresponen al pH del medi mucosal i serosal, respectivament. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 14-16$ sacs per al duodè, $n = 20-21$ per al jejú i $n = 18-21$ per al ili. *Diferències estadísticament significatives en l'aparició serosal de monòmer en presència o absència de gradient de H^+ per a un mateix segment intestinal ($P < 0,05$). #Diferències estadísticament significatives entre substrats ($P < 0,05$). Les mitjanes senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents per a cada condició de pH ($P < 0,05$).

L'aparició serosal de monòmer en absència de Na^+ (Taula 13) és similar a l'obtinguda en presència d'aquest ió. A més, els resultats mostren el mateix perfil regional descrit a la Figura 31.

DL-HMB-PCM	pHm 5,5 – pHs 7,4		pHm 7,4 – pHs 7,4	
	presència Na^+	absència Na^+	presència Na^+	absència Na^+
Duodè	45,3 $\pm$ 2,6	46,9 $\pm$ 3,8	41,1 $\pm$ 3,7	35,9 $\pm$ 8,9
Jejú	94,1 $\pm$ 4,9	82,5 $\pm$ 7,8	82,2 $\pm$ 5,3	78,1 $\pm$ 3,8
Ili	85,1 $\pm$ 6,0	85,9 $\pm$ 8,6	58,1 $\pm$ 6,3	58,4 $\pm$ 8,1
DL-HMB	pHm 5,5 – pHs 7,4		pHm 7,4 – pHs 7,4	
	presència Na^+	absència Na^+	presència Na^+	absència Na^+
Duodè	40,8 $\pm$ 6,2	38,6 $\pm$ 5,1	32,0 $\pm$ 3,4	31,1 $\pm$ 8,2
Jejú	93,2 $\pm$ 12,2	83,1 $\pm$ 11,8	57,8 $\pm$ 5,8	55,9 $\pm$ 4,1
Ili	82,2 $\pm$ 6,9	78,8 $\pm$ 8,6	64,1 $\pm$ 5,5	63,4 $\pm$ 5,0

Taula 13. Aparició de monòmer en el medi serosal de sacs evertits incubats durant 30 min amb 7 mmol/L DL-HMB-PCM o DL-HMB, en presència (pHm 5,5 – pHs 7,4) o absència (pHm 7,4 – pHs 7,4) de gradient de H^+ i en presència o absència de Na^+ . pHm i pHs corresponen al pH del medi mucosal i serosal, respectivament. Els resultats en presència de Na^+ corresponen als representats

en la Figura 31. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ sacs en el cas dels valors obtingut en absència de Na^+ . L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives entre l'acumulació de monòmer en presència o absència de Na^+ per a un mateix substrat, condició de pH i segment intestinal ($P < 0,05$).

Un cop determinat que no hi ha diferències en el transport intestinal d'ambdós productes, s'ha estudiat si la conversió del DL-HMB en L-Met i posterior metabolització a L-Cys i Tau en l'intestí prim de pollastre és un factor limitant en la utilització d'aquest hidroxianàleg. Per aquest motiu, s'ha determinat l'aparició serosal de Met després de la incubació dels sacs evertits amb DL-HMB i s'ha comparat l'aparició serosal de Cys, Tau i d'altres aminoàcids no-sofrats després de la incubació amb DL-HMB o L-Met. Atès que l'anàlisi no permet diferenciar entre estereoisòmers, els resultats es refereixen com a aparició total de l'aminoàcid a la mostra.

4.1.7. Aparició de Met en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB

L'aparició de Met en el medi serosal s'ha determinat en sacs evertits de duodè, jejú i ili incubats durant 30 min amb 7 mmol/L DL-HMB, en presència i absència d'un gradient de H^+ . Els resultats (Figura 32) mostren valors més elevats en presència de H^+ , encara que no s'observen diferències estadísticament significatives en el jejú. La comparació entre els diferents segments intestinals no revela diferències estadísticament significatives, excepte a pHm 7,4 on els resultats obtinguts són més baixos per al duodè respecte al jejú.

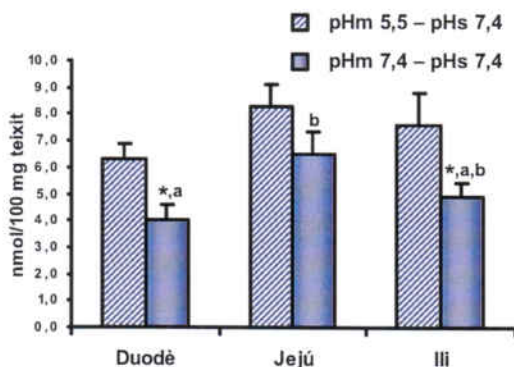


Figura 32. Aparició de Met en el medi serosal de sacs evertits incubats durant 30 min amb 7 mmol/L DL-HMB, en presència (pHm 5,5 – pHs 7,4) o absència (pHm 7,4 – pHs 7,4) de gradient de H^+ . pHm i pHs correspon al pH del medi mucosal i serosal, respectivament. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 8$ sacs per al duodè i $n = 13$ per al jejú i l'ili. *Diferències estadísticament significatives entre les diferents condicions de pH ($P < 0,05$). Les barres senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents per a cada condició de pH ($P < 0,05$).

Atès que, tant el transport de DL-HMB com l'aparició de Met són més grans en presència de gradient de H^+ , l'aparició de Cys, Tau i d'altres aminoàcids després de la incubació amb DL-HMB i L-Met només s'ha estudiat a pHm de 5,5.

4.1.8. Aparició de Cys en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB i L-Met

Els resultats de l'aparició de Cys en el medi serosal (**Figura 33**) mostren valors més elevats després de la incubació amb DL-HMB en els tres segments intestinals, en comparació amb els resultats obtinguts després de la incubació amb L-Met. L'anàlisi regional per ambdós substrats indica que no hi ha diferències entre el duodè, jejú i ili.

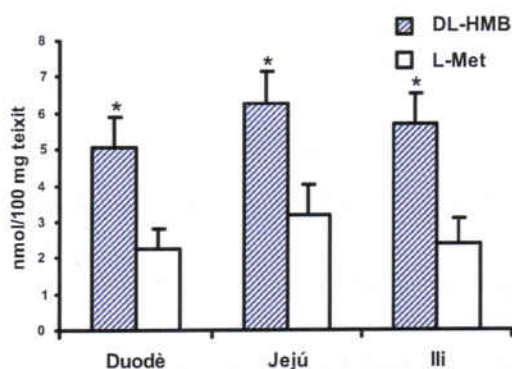


Figura 33. Aparició de Cys en el medi serosal de sacs evertits incubats durant 30 min amb 7 mmol/L DL-HMB o L-Met, en presència de gradient de H^+ (pHm 5,5 – pHs 7,4). Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 7$ sacs per al duodè i $n = 9$ per al jejú i l'ili. *Diferències estadísticament significatives entre ambdós substrats ($P < 0,05$). L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives entre els diferents segments intestinals ($P > 0,05$).

4.1.9. Aparició de Tau en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB i L-Met

Els resultats de l'aparició de Tau en el medi serosal (**Figura 34**) mostren, com en el cas de la Cys, valors més elevats després de la incubació amb DL-HMB. Per ambdós substrats, el duodè mostra els valors més baixos en comparació amb els segments intestinals més distals.

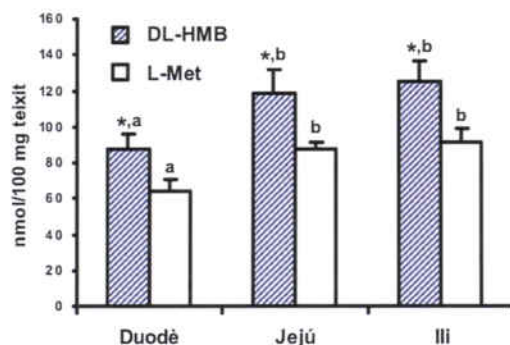


Figura 34. Aparició de Tau en el medi serosal de sacs evertits incubats durant 30 min amb 7 mmol/L DL-HMB o L-Met, en presència de gradient de H^+ (pHm 5,5 – pHs 7,4). Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 7$ sacs per al duodè i $n = 9$ per al jejú i l'ili. *Diferències estadísticament significatives entre ambdós substrats ($P < 0,05$). Les barres senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents per a cada substrat ($P < 0,05$).

4.1.10. Aparició d'aminoàcids no-sofrats en el medi serosal després de la incubació amb DL-HMB i L-Met

L'aparició d'aminoàcids no-sofrats en el medi serosal, ordenats per la seva aparició en el cromatograma (**Taula 14**), és similar en els tres segments intestinals tant si la incubació ha estat amb DL-HMB o amb L-Met, suggerint que no es veu afectada per la font de Met utilitzada. Si es comparen les dades obtingudes amb l'aparició d'aminoàcids sofrats, s'observa que la Tau és l'aminoàcid lliure més abundant en el medi serosal. En canvi, la Met i la Cys mostren valors molt més reduïts.

nmol/100 mg teixit	Duodé		Jejú		Ili	
	DL-HMB	L-Met	DL-HMB	L-Met	DL-HMB	L-Met
Aspàrtic	26,6 ± 3,6	25,7 ± 6,8	28,7 ± 1,5	28,9 ± 1,5	27,3 ± 2,3	25,8 ± 2,0
Treonina	15,0 ± 3,0	15,0 ± 3,2	13,6 ± 0,9	13,4 ± 1,6	9,8 ± 1,2	9,5 ± 1,4
Serina	29,9 ± 3,9	29,8 ± 3,0	22,6 ± 1,4	20,2 ± 1,9	17,5 ± 2,3	18,0 ± 3,0
Glutàmic	49,9 ± 3,5	47,5 ± 2,6	46,7 ± 2,5	47,4 ± 3,3	44,2 ± 3,6	44,6 ± 4,4
Glutamina	33,4 ± 2,3	33,0 ± 1,8	41,6 ± 2,8	40,5 ± 4,0	43,7 ± 3,9	44,6 ± 3,3
Prolina	18,3 ± 3,2	18,2 ± 1,4	15,9 ± 2,4	15,5 ± 2,1	12,2 ± 1,0	11,2 ± 1,1
Glicina	50,3 ± 6,2	49,4 ± 8,1	32,4 ± 2,2	32,1 ± 3,6	30,4 ± 2,1	30,3 ± 2,3
Alanina	46,0 ± 3,3	45,0 ± 2,1	42,7 ± 3,6	40,1 ± 4,5	38,5 ± 3,5	38,2 ± 2,2
Valina	17,5 ± 3,4	18,4 ± 3,2	10,8 ± 1,1	8,1 ± 1,0	9,2 ± 1,5	8,6 ± 0,9
Isoleucina	11,6 ± 1,9	10,6 ± 1,9	6,4 ± 0,6	5,9 ± 0,8	5,7 ± 1,1	5,8 ± 1,0
Leucina	18,9 ± 2,8	18,3 ± 2,7	12,2 ± 1,1	13,0 ± 1,1	10,0 ± 1,4	10,6 ± 1,6
Tirosina	8,1 ± 0,8	7,6 ± 1,5	6,0 ± 0,6	6,0 ± 1,6	5,3 ± 1,4	5,0 ± 1,0
Fenilalanina	8,4 ± 1,4	8,1 ± 1,7	8,2 ± 0,7	8,1 ± 1,4	7,4 ± 0,6	6,3 ± 0,7
Ornitina	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,5 ± 0,4	1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,2
Lisina	15,4 ± 2,4	15,4 ± 3,0	11,7 ± 0,9	10,9 ± 1,5	10,2 ± 1,3	9,1 ± 1,0
Histidina	4,5 ± 0,5	4,1 ± 0,6	3,5 ± 0,3	3,6 ± 0,5	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,8
Arginina	7,9 ± 2,1	7,4 ± 1,3	9,3 ± 0,6	8,0 ± 0,7	8,0 ± 1,0	8,4 ± 0,9

Taula 14. Aparició d'aminoàcids no-sofrats en el medi serosal de sacs evertits incubats durant 30 min amb 7 mmol/L DL-HMB o L-Met, en presència de gradient de H^+ (pHm 5,5 – pHs 7,4). Els aminoàcids es mostren per ordre d'aparició en el cromatograma. Els resultats s'expressen com a mitjana ± ES de n = 7 sacs per al duodé i n = 9 per al jejú i l'ili. L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives entre ambdós substrats ($P > 0,05$).

4.2. Estudis en cèl·lules intestinals Caco-2

Per tal de conèixer el mecanisme responsable de l'absorció intestinal del DL-HMB, s'ha caracteritzat el transport a través de la membrana apical de cèl·lules Caco-2. Aquest estudi s'ha realitzat en cèl·lules mantingudes durant 21 dies en filtres amb medi Control.

4.2.1. Permeabilitat paracel·lular i concentració de proteïnes

Els estudis de transport en filtres han d'anar precedits de l'avaluació de la permeabilitat paracel·lular per tal d'assegurar una bona integritat de la monocapa en el moment de la realització d'aquests experiments. Aquesta variable s'ha avaluat a partir de la TEER, determinada abans de cada experiment. Els resultats mostren uns valors de TEER de 378,9

$\pm 6,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 40$ filtres), valors adients per a la realització dels experiments de transport en aquestes cèl·lules (Jiang *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 1999). A més, per tal de normalitzar els resultats obtinguts, s'ha determinat la concentració de proteïnes dels cultius mantinguts en filtres. La mitjana és de $288,3 \pm 6,3 \mu\text{g proteïna}/\text{cm}^2$ ($n = 4$ filtres), de l'ordre de l'obtinguda per altres autors en condicions similars (Ferruzza *et al.*, 1995).

4.2.2. Efecte del gradient de H^+ i de Na^+ en el transport apical de DL-HMB

S'ha comparat el transport apical de DL-HMB ($100 \mu\text{mol/L}$) després de 5 min d'incubació a dos pH diferents en el compartiment apical (pHa 5,5 o 7,4), mantenint un pH en el compartiment basolateral de 7,4 (pHb 7,4). D'aquesta manera, s'ha establert les condicions de presència (pHa 5,5 – pHb 7,4) i absència (pHa 7,4 – pHb 7,4) de gradient de H^+ . A més, s'ha determinat el transport en presència (Control) o absència (ChoCl) de Na^+ per tal d'estudiar la possible dependència del gradient de Na^+ en ambdues condicions de pH. Els resultats (**Figura 35**) mostren valors similars tant en presència com en absència d'un gradient de H^+ i valors més elevats en presència de Na^+ en el medi d'incubació en les dues condicions de pH.

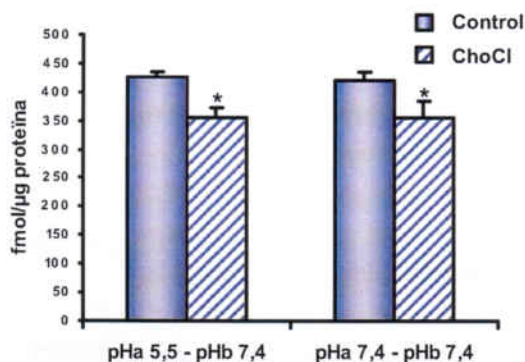


Figura 35. Transport apical de DL-HMB ($100 \mu\text{mol/L}$, $0,2 \mu\text{Ci/mL}$) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència (pHa 5,5 – pHb 7,4) o absència (pHa 7,4 – pHb 7,4) de gradient de H^+ i presència (Control) o absència (ChoCl) de gradient de Na^+ . Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 17$ i $n = 14$ filtres per al Control i ChoCl, respectivament. *Diferències estadísticament significatives per a cada condició de pH ($P < 0,05$).

Atès que els resultats no posen de manifest la dependència de H^+ del transport de DL-HMB descrita en aquest mateix treball en sacs evertits d'intestí de pollastre, s'ha assajat l'efecte del protonòfor p-trifluorofenilhidrazonacarbonilcianamida (FCCP, $50 \mu\text{mol/L}$). Els

resultats (**Taula 15**) mostren una reducció significativa dels valors obtinguts respecte a la condició Control per ambdues condicions de pH, fet que suggereix que el transport de l'hidroxianàleg està associat a un sistema dependent de gradient de H^+ . Atès que el gradient de H^+ a través de la membrana es manté gràcies al bescanviador Na^+/H^+ apical (NHE3), s'ha estudiat el transport de DL-HMB en presència de *N*-etil-*N*-isopropilamilorida (EIPA, 1 mmol/L), inhibidor de l'NHE3 (Orlowski, 1993). Els resultats (**Taula 15**) mostren una reducció significativa del transport en ambdues condicions de pH establertes.

Condicció de pH		fmol/ μ g proteïna
pHa 5,5 – pHb 7,4	Control	425,9 $\pm$ 9,9
	FCCP (50 μ mol/L)	134,6 $\pm$ 11,1 *
	EIPA (1 mmol/L)	185,5 $\pm$ 19,2 *
pHa 7,4 – pHb 7,4	Control	421,3 $\pm$ 12,6
	FCCP (50 μ mol/L)	114,2 $\pm$ 4,6 *
	EIPA (1 mmol/L)	163,4 $\pm$ 24,4 *

Taula 15. Transport apical de DL-HMB (100 μ mol/L) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència (pHa 5,5 – pHb 7,4) o absència (pHa 7,4 – pHb 7,4) de gradient de H^+ i en absència (Control) o presència de 50 μ mol/L FCCP o 1 mmol/L EIPA. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres. *Diferències estadísticament significatives respecte a la corresponent condició Control ($P < 0,05$).

Així doncs, la manca d'efecte del gradient de H^+ imposat i la inhibició del transport observada a pH 7,4 amb FCCP i amb EIPA podrien ésser degudes a la capacitat del bescanviador NHE3 per generar i mantenir un gradient de H^+ a través de la membrana apical. En aquest sentit, Anderson *et al.* (2004) observaren que, en incubacions a temps curts, el gradient de H^+ imposat pot mantenir l'entrada d'aminoàcids a través del sistema PAT1, mentre que a temps més llargs seria necessària l'activitat del bescanviador NHE3 per mantenir aquest gradient i, per tant, el transport. Així, 5 min d'incubació podrien ésser suficients per a què el bescanviador NHE3 generi un gradient de H^+ que redueixi les diferències entre les condicions de pH establertes en aquest treball. Per aquesta raó, s'ha estudiat el transport de DL-HMB després d'1 min d'incubació per intentat reflectir només l'efecte del gradient de H^+ , sense la participació del bescanviador. Els resultats (**Figura 36**) mostren valors més elevats en presència d'un gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4). A més, la inhibició del bescanviador NHE3 amb EIPA no afecta el transport de l'hidroxianàleg, fet que confirma la reduïda contribució de l'NHE3 a temps curts d'incubació.

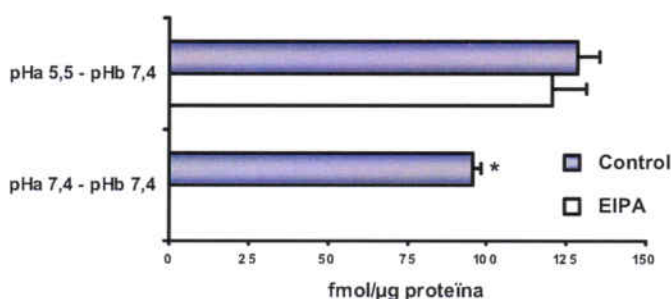


Figura 36. Transport apical de DL-HMB (100 µmol/L) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 1 min en presència (pHa 5,5 – pHb 7,4) o absència (pHa 7,4 – pHb 7,4) de gradient de H^+ i d'EIPA (1 mmol/L). Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres. *Diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) respecte a la resta de condicions.

Per tal de confirmar si el DL-HMB es cotransporta amb H^+ , s'ha determinat el pH_i durant el període d'incubació amb el substrat (20 mmol/L). En el registre obtingut (**Figura 37**) s'observa una clara davallada del pH_i durant la incubació amb l'hidroxianàleg. Quan el substrat es retira del medi i les cèl·lules s'incuben a un pH apical de 7,4, el pH_i es recupera fins assolir valors similars a la condició Control, gràcies a l'activitat del bescanviador. La contribució de l'NHE3 es confirma amb els resultats obtinguts en presència d'EIPA, ja que les cèl·lules no poden recuperar el pH_i .

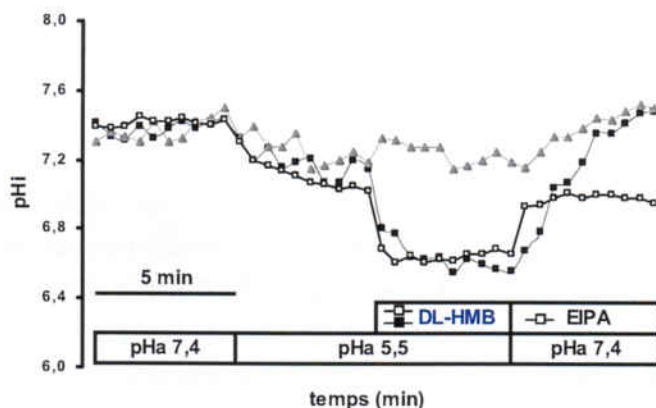


Figura 37. Registre del pH_i en cèl·lules prèviament carregades amb 7,5 µmol/L BCECF (fluorocrom sensible al pH) durant 40 min a 37°C. Les cèl·lules es renten i s'incuben en les condicions de pH apical que s'indiquen a la figura en absència (Δ) o presència ($\blacksquare$, $\square$) de 20 mmol/L DL-HMB i d'1 mmol/L EIPA ($\square$). El pH del compartiment basolateral s'ha mantingut a 7,4. Els resultats són la mitjana de $n = 3$ filtres per a cada condició.

4.2.3. Inhibició *cis* del transport apical de DL-HMB en presència d'un gradient de H^+

Per tal de caracteritzar el sistema de transport implicat en el transport de DL-HMB, s'ha portat a terme un seguit d'experiments d'inhibició *cis* amb substrats i inhibidors específics dels sistemes de transport dependents de H^+ que tot seguit es detallen. En primer lloc, s'ha assajat la possible contribució dels sistemes PAT1 i PepT1. Els resultats (**Taula 16**) mostren que ni la presència de 20 mmol/L D-prolina, L-alanina, β -alanina o betaïna, substrats específics del sistema PAT1 (Thwaites *et al.*, 1993b; Boll *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003), ni la presència de 20 mmol/L glicil-sarcosina (Gly-Sar), substrat específic del sistema PepT1 (Sugawara *et al.*, 2000), modifiquen el transport de DL-HMB a través de la membrana apical de cèl·lules Caco-2.

		fmol/ μ g proteïna
	Control	425,9 $\pm$ 9,9
Substrats específics del sistema PAT1	D-prolina (20 mmol/L)	421,8 $\pm$ 35,9
	L-alanina (20 mmol/L)	432,4 $\pm$ 30,1
	β -alanina (20 mmol/L)	414,8 $\pm$ 20,4
	betaïna (20 mmol/L)	406,8 $\pm$ 54,0
Substrat específic del sistema PepT1	Gly-Sar (20 mmol/L)	434,1 $\pm$ 55,8

Taula 16. Transport apical de DL-HMB (100 μ mol/L) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4) i 20 mmol/L D-prolina, L-alanina, β -alanina o betaïna com a substrats específics del sistema PAT1, o 20 mmol/L Gly-Sar com a substrat específic del sistema PepT1. Els resultats dels diferents substrats específics s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres. L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives respecte a la condició Control ($P > 0,05$).

Un cop descartada la participació dels sistemes PAT1 i PepT1, s'ha assajat la possible contribució del sistema MCT1. La floretina (0,2 mmol/L) i l'àcid α -ciano-4-hidroxicinnàmic (CHC, 1 mmol/L), inhibidors específics d'aquest sistema de transport (Halestrap i Meredith, 2004), redueixen significativament el transport de DL-HMB (**Figura 38A**). A més, el L-lactat, piruvat, β -hidroxibutirat i butirat, però no el D-lactat (20 mmol/L), inhibeixen significativament el transport apical de l'hidroxianèleg (**Figura 38B**).

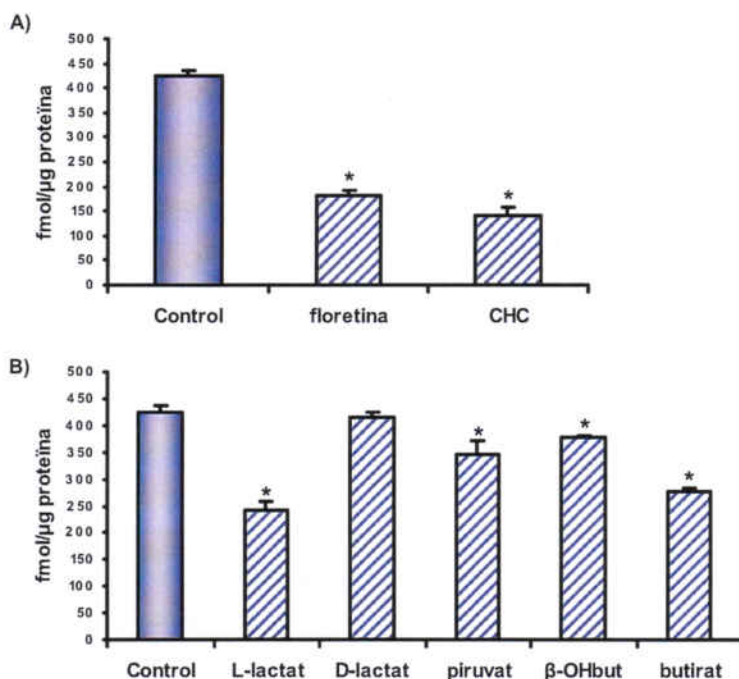


Figura 38. Transport apical de DL-HMB (100 µmol/L) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4) i **A)** floretina (0,2 mmol/L) o CHC (1mmol/L) com a inhibidors del sistema MCT1, i **B)** 20 mmol/L L-lactat, D-lactat, piruvat, β-hidroxibutirat (β-OHbut) o butirat, com a substrats del sistema MCT1. Els resultats dels diferents inhibidors i substrats específics s'expressen com a mitjana ± ES de $n = 3$ filtres. *Diferències estadísticament significatives respecte a la condició Control ($P < 0,05$).

4.2.4. Transport apical de DL-HMB en absència d'un gradient de H^+

Un cop identificat funcionalment el sistema de transport per al DL-HMB, s'ha aprofundit en l'estudi de la seva dependència del pH del medi d'incubació. Tenint en compte la hipòtesi abans esmentada que el bescanviador NHE3 seria capaç d'establir i mantenir el gradient de H^+ durant 5 min d'incubació, s'ha comprovat la participació del sistema MCT1 a un pHa de 7,4. En aquestes condicions, el transport de DL-HMB (**Figura 39**) també és inhibït pel CHC (1 mmol/L) i pel L-lactat (20 mmol/L). A més, per tal de discriminar entre la capacitat del sistema MCT1 per funcionar en absència de gradient de H^+ o la contribució de l'NHE3 per generar aquest gradient, s'ha determinat l'efecte del CHC en condicions en les que el bescanviador NHE3 està totalment inhibït (absència de gradient de Na^+ i presència d'EIPA). Els resultats no mostren cap efecte de l'inhibidor del sistema MCT1 (EIPA: $161,6 \pm 2,4$

fmol/ μ g proteïna i EIPA + CHC: $170,8 \pm 16,5$ fmol/ μ g proteïna, $n = 3$, $P > 0,05$), confirmant que és el bescanviador el que contribueix en gran mesura al transport de DL-HMB en absència de gradient de H^+ .

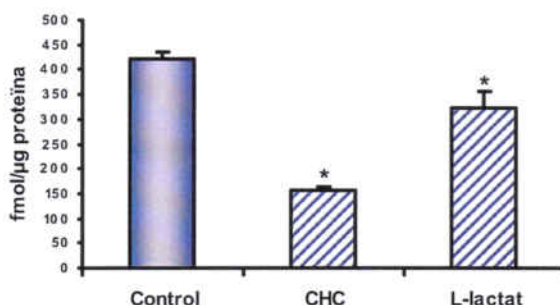


Figura 39. Transport apical de DL-HMB (100 μ mol/L) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en absència de gradient de H^+ (pHa 7,4 – pHb 7,4; Control) o en presència d'1 mmol/L CHC o 20 mmol/L L-lactat. Els resultats dels diferents substrats específics s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres. *Diferències estadísticament significatives respecte la condició Control ($P < 0,05$).

4.2.5. Constants cinètiques del transport apical de DL-HMB

Per tal de determinar les constants cinètiques del DL-HMB, s'ha estudiat el transport a diferents concentracions de substrat (0 – 40 mmol/L). El component no-mediat (**Figura 40**) s'ha determinat en presència d'1 mmol/L CHC, obtenint-se una K_d d'1,9 nL/ μ g proteïna. Un cop restat aquest component al transport total de DL-HMB, el millor ajust per al component mediat és el que considera la participació d'un únic sistema de transport, de baixa afinitat i elevada capacitat (Figura 40), amb una K_m de $13,1 \pm 0,04$ mmol/L i una V_{max} $43,6 \pm 0,14$ pmol/ μ g proteïna.

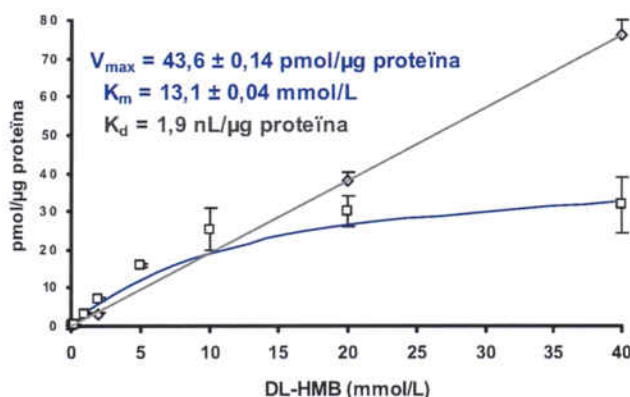


Figura 40. Transport apical de concentracions creixents de DL-HMB (0 – 40 mmol/L; 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4). El component no-medit ($\diamond$) s'ha estimat ($R^2 = 0,999$) en presència d'1 mmol/L CHC i s'ha restat del transport total. El millor ajust per al component mediat ($\square$) és el que considera la participació d'un únic sistema de transport. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ -4 filtres.

Atès que el L-lactat és un substrat específic del sistema MCT1 (Halestrap i Meredith, 2004) s'ha fet un estudi cinètic de la interacció del DL-HMB amb el L-lactat amb l'objecte d'esbrinar si ambdós comparteixen aquest mateix transportador. Així doncs, s'ha estudiat el transport apical de L-lactat a diferents concentracions (1, 2 i 3 mmol/L) en presència de concentracions creixents de DL-HMB (0, 5, 10 i 15 mmol/L). La cinètica de Dixon (**Figura 41**) posa de relleu una inhibició competitiva del DL-HMB vers el L-lactat amb una K_i de $17,5 \pm 0,11$ mmol/L.

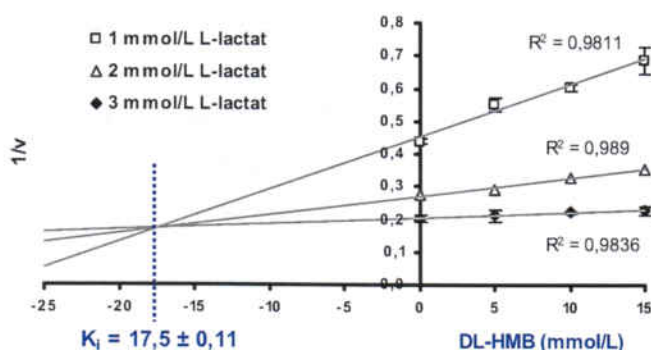


Figura 41. Cinètica de Dixon del transport apical d'1, 2 i 3 mmol/L de L-lactat (0,2 $\mu\text{Ci/mL}$) en presència 0, 5, 10 i 15 mmol/L DL-HMB en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4). La K_i determinada per regressió lineal és de $17,5 \pm 0,11$ mmol/L. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres.

4.2.6. Transport apical de DL-HMB en presència de L- o D-Met

Els resultats de la caracterització del sistema de transport per al DL-HMB descarten *a priori* la interacció d'ambdós substrats per a un mateix transportador. Tanmateix, i atès que la interacció no havia estat mai estudiada en presència d'un gradient de H^+ , s'ha testat en aquestes condicions experimentals.

Els resultats obtinguts per al transport de apical de DL-HMB (100 $\mu\text{mol/L}$) en presència d'un gradient de H^+ i de 20 mmol/L L- o D-Met (**Figura 42**) no difereixen del Control.

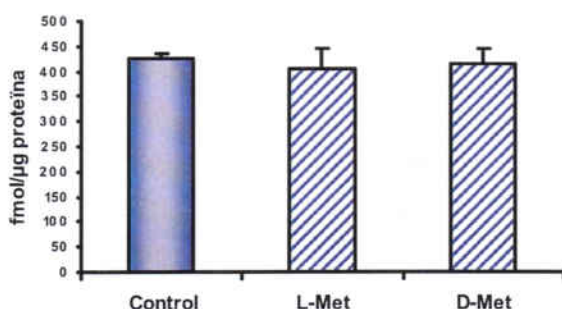


Figura 42. Transport apical de DL-HMB (100 $\mu\text{mol/L}$) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4) i 20 mmol/L L- o D-Met. Els valors de la condició Control corresponen als de la Figura 35. Els resultats dels diferents substrats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 6$ filtres. L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives respecte la condició Control ($P > 0,05$).

4.2.7. Transport apical de L- i D-Met en presència de DL-HMB

Els resultats obtinguts per al transport apical de L-Met i D-Met (100 $\mu\text{mol/L}$) en presència de 20 mmol/L DL-HMB (**Figura 43**) difereixen segons la condició de pH establerta. Mentre que en presència de gradient de H^+ el DL-HMB produeix una inhibició del transport tant de L- com de D-Met, en absència de gradient de H^+ no s'observa aquest efecte.

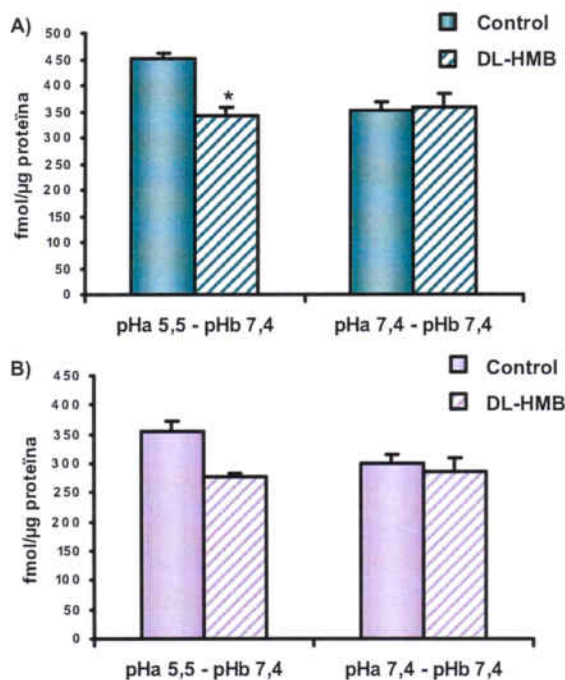


Figura 43. Transport apical de (100 $\mu\text{mol/L}$, 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$) L-Met (A) i D-Met (B) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència (pHa 5,5 – pHb 7,4) o en absència (pHa 7,4 – pHb 7,4) de gradient de H^+ i 20 mmol/L DL-HMB. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 8-14$ filtres per la condició Control i $n = 6$ filtres per la condició DL-HMB. *Diferències estadísticament significatives respecte al Control per a cada condició de pH ($P < 0,05$).

Així doncs, el DL-HMB interacciona aparentment amb un component dependent de H^+ del transport de L-Met i D-Met. Aquest efecte de l'hidroxianàleg s'ha estudiat aleshores en absència de gradient de Na^+ . Els resultats (Figura 44) segueixen un perfil similar a l'obtingut en l'apartat anterior; només s'observa efecte del DL-HMB a pHa de 5,5.

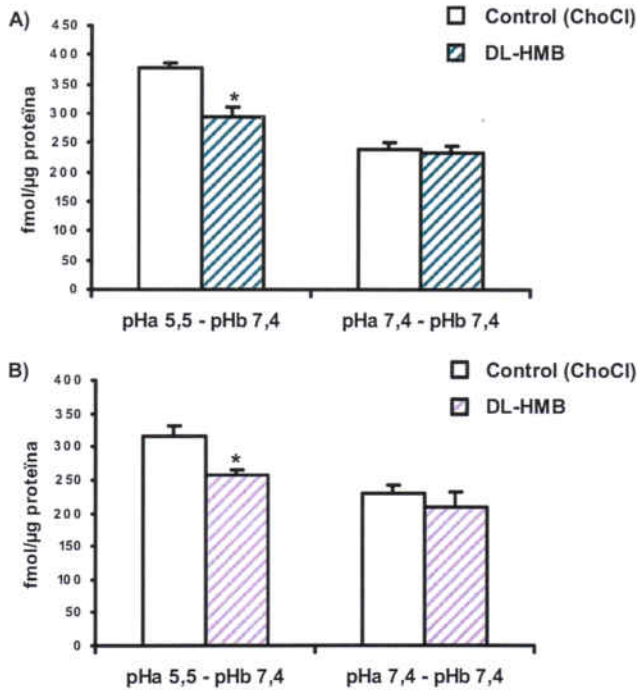


Figura 44. Transport apical de 100 µmol/L L-Met (**A**) i D-Met (**B**) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en absència de gradient de Na^+ (Control, ChoCl) en presència (pHa 5,5 – pHb 7,4) o en absència (pHa 7,4 – pHb 7,4) de gradient de H^+ i en presència de 20 mmol/L DL-HMB. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 5$ filtres per la condició Control i $n = 3$ filtres per la condició DL-HMB. *Diferències estadísticament significatives respecte al Control ($P < 0,05$).

Aquests resultats posen de manifest que el DL-HMB interacciona amb un component del transport de L- i D-Met dependent del gradient de H^+ no descrit anteriorment.

4.2.8. Caracterització del mecanisme responsable de la interacció del DL-HMB amb el transport apical de L-Met

En primer lloc, s'ha investigat si el sistema MCT1 pot reconèixer la L-Met com a substrat. Els resultats (**Figura 45**) mostren, però, que la presència de L-lactat (20 mmol/L) o de CHC (1 mmol/L) no afecten el transport de L-Met, descartant-se així la participació d'aquest sistema en el transport de l'aminoàcid. A més, el DL-HMB inhibeix el transport de L-Met en presència de CHC, confirmant-se que la interacció no es produeix a través d'aquest sistema.

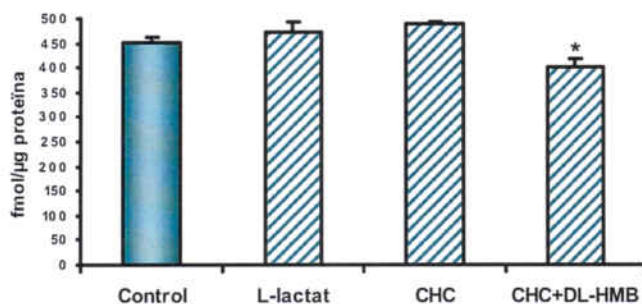


Figura 45. Transport apical de L-Met (100 µmol/L) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4) i en presència de L-lactat (20 mmol/L), CHC (1 mmol/L) o CHC més DL-HMB (1 mmol/L i 20 mmol/L, respectivament). Els valors de la condició Control corresponen als resultats en presència d'un gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4) de la Figura 43. Els resultats dels diferents substrats i inhibidors específics del sistema MCT1 s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres. *Diferències estadísticament significatives respecte la condició Control ($P < 0,05$).

El següent pas ha estat investigar si la interacció es produeix a través del sistema PAT1. Els resultats obtinguts amb betaïna i D-prolina (**Figura 46**) descarten la participació d'aquest sistema en el transport de L-Met dependent de H^+ .

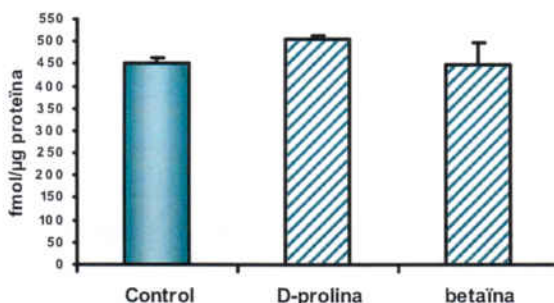


Figura 46. Transport apical de L-Met (100 µmol/L) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4) i en presència de D-prolina o betaïna (20 mmol/L). Els resultats dels diferents substrats específics del sistema PAT1 s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres. L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives respecte la condició Control ($P > 0,05$).

Així doncs, s'ha procedit a investigar si la interacció es produeix sobre algun dels sistemes de transport descrits prèviament per a la L-Met i que es veuria afectat per la presència d'un gradient de H^+ . Els sistemes B, $B^{0,+}$ i L són sensibles a BCH (Stevens *et al.*,

1984; Sloan i Mager, 1999), mentre que els sistemes $B^{0,+}$, $b^{0,+}$ i y^+ poden transportar aminoàcids catiónics com la L-lisina. Així doncs, s'ha estudiat l'efecte del DL-HMB sobre el transport de L-Met en presència de BCH o L-lisina. Els resultats (**Figura 47**) mostren que la presència de DL-HMB no exerceix cap efecte addicional sobre la inhibició obtinguda amb L-lisina o amb BCH, suggerint que la interacció s'ha de produir amb un sistema de transport sensible a L-lisina i BCH, és a dir, amb el sistema $B^{0,+}$.

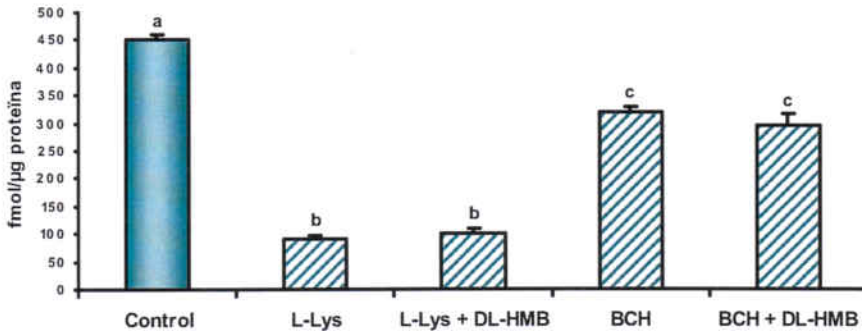


Figura 47. Transport apical de L-Met (100 µmol/L) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4) i en presència de L-lisina (L-Lys, 20 mmol/L), L-Lys més DL-HMB (10 mmol/L cada substrat), BCH (20 mmol/L) o BCH més DL-HMB (10 mmol/L cada substrat). Els resultats dels diferents substrats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres. Les barres senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents ($P < 0,05$).

Per tal de confirmar aquests resultats, s'ha estudiat l'efecte del DL-HMB sobre el transport de Tau. Aquest aminoàcid és transportat pels sistemes de transport TauT (Moyer *et al.*, 1988; Roig-Pérez *et al.*, 2005), PAT1 (Thwaites i Stevens, 1999) i $B^{0,+}$ (Van Winkle *et al.*, 1985). Per tant, tenint en compte que la L-Met no es reconeguda ni pel sistema TauT ni per el sistema PAT1, aquests dos aminoàcids només comparteixen el sistema $B^{0,+}$. Els resultats (**Figura 48**) mostren inhibició del DL-HMB sobre el transport de Tau tant sols en presència de gradient de H^+ . A més, la manca d'inhibició addicional sobre l'obtinguda amb BCH confirma la interacció del DL-HMB sobre el sistema $B^{0,+}$.

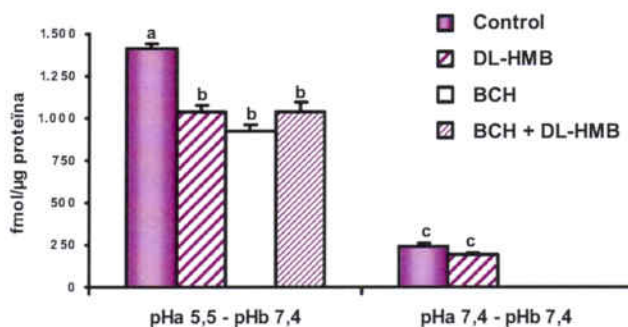


Figura 48. Transport apical de Tau (100 µmol/L, 0,2 µCi/mL) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 - pHb 7,4) o en absència (pHa 7,4 - pHb 7,4) de gradient de H^+ i en presència de DL-HMB (20 mmol/L), BCH (20 mmol/L) o BCH més DL-HMB (10 mmol/L cada substrat). Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres. Les barres senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents ($P < 0,05$).

4.2.9. Caracterització cinètica de la interacció del DL-HMB amb el transport apical de L-Met

Per tal de caracteritzar el tipus d'interacció existent entre el DL-HMB i la Met, s'ha estudiat el transport apical a diferents concentracions de L-Met (0,25 - 0,5 - 1 mmol/L) en presència de concentracions creixents de DL-HMB (0 - 5 - 10 i 15 mmol/L). La cinètica de Dixon (**Figura 49**) mostra una inhibició acompetitiva del DL-HMB vers la L-Met.

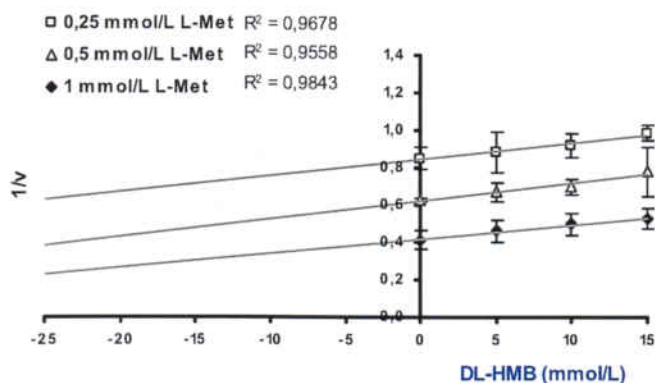


Figura 49. Cinètica de Dixon del transport apical de 0,25 - 0,5 - 1 mmol/L de L-Met (0,2 µCi/mL) en presència de 0, 5, 10 i 15 mmol/L DL-HMB en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 - pHb 7,4). Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres.

4.2.10. Viabilitat cel·lular dels cultius mantinguts en plaques amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met

Un dels objectius a assolir ha estat investigar la regulació del transport de DL-HMB pel contingut de diferents fonts de Met en el medi de cultiu. Tenint en compte, però, que el creixement cel·lular es pot veure afectat per les condicions de cultiu, s'ha fet un estudi previ sobre la viabilitat i integritat de l'epiteli en els cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met.

La concentració òptima de Met per al creixement i diferenciació de les cèl·lules Caco-2 és de 0,2 mmol/L, de manera que els medis comercials contenen de 0,2 mmol/L de L-Met en la seva composició. Així doncs, el primer estudi de viabilitat ha consistit en determinar el nombre de cèl·lules viables després de 21 dies en cultiu amb 0,2 mmol/L L-Met o DL-Met i comparar-ho amb el nombre de cèl·lules viables mantingudes en cultiu amb el medi comercial (Control). Els resultats (**Figura 50**) mostren valors similars per a cultius mantinguts amb DL-Met, L-Met o medi Control, descartant així que l'addició d'una font de Met al medi de cultiu afecti negativament aquesta variable. A més, es pot considerar que, en aquestes condicions, la DL-Met pot substituir completament la L-Met requerida per el creixement d'aquest cultiu.

Un cop realitzada aquesta prova, l'estudi s'ha ampliat tot substituint la L-Met per 0,2 mmol/L de DL-HMB o DL-Met per tal de comparar el nombre cèl·lules viables després de 3, 7, 14 i 21 dies en cultiu. Els resultats (**Figura 50**) mostren un increment del nombre de cèl·lules viables fins als 14 dies, seguit d'una disminució després de 21 dies en cultiu en el cas de la DL-Met. Si es comparen ambdós substrats, es pot observar un nombre de cèl·lules considerablement superior en els cultius mantinguts amb DL-Met en comparació amb el creixement obtingut amb DL-HMB.

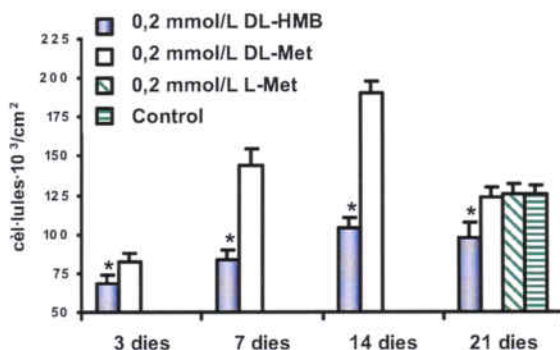


Figura 50. Nombre de cèl·lules Caco-2 viables per superfície de creixement en cultius mantinguts durant 3, 7, 14 i 21 dies en un medi amb 0,2 mmol/L DL-HMB, DL-Met, L-Met o en un medi Control (medi comercial que conté 0,2 mmol/L de L-Met). Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 17-20$ cultius. *Diferències estadísticament significatives entre substrats ($P < 0,05$).

Per tal de valorar l'estat de diferenciació assolit pels cultius, s'ha determinat l'activitat sacarasa en cultius mantinguts durant 21 dies amb 0,2 mmol/L DL-HMB o DL-Met com a font de Met i s'ha comparat amb l'obtingut en cultius mantinguts amb un medi Control. Els resultat (**Taula 17**) mostren una activitat similar en les tres condicions assajades.

Activitat sacarasa (21 dies)	mU/mg prot
0,2 mmol/L DL-HMB	53,7 $\pm$ 1,9
0,2 mmol/L DL-Met	53,8 $\pm$ 1,8
Control (0,2 mmol/L L-Met)	53,4 $\pm$ 2,8

Taula 17. Activitat sacarasa en l'homogenat de cèl·lules Caco-2 després de 21 dies en cultiu amb 0,2 mmol/L DL-HMB o DL-Met i amb medi Control. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 7$ cultius. L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives entre les diferents condicions ($P > 0,05$).

Un cop observat el comportament d'ambdues fonts a una concentració òptima per al creixement i diferenciació de les cèl·lules Caco-2, s'ha estudiat el nombre de cèl·lules viables en cultius mantinguts durant 3, 7, 14 i 21 dies amb DL-HMB o DL-Met com a font de Met a una concentració de 0,02 mmol/L (**Figura 51**). En el cas dels cultius mantinguts amb DL-HMB, el nombre de cèl·lules viables obtingut és molt similar al nombre de cèl·lules sembrades a l'inici de l'estudi (50.000 cèl·lules/cm²), i fins i tot aquest valor és inferior després de 3 i 21 dies en cultiu. En el cas de la DL-Met, després de 3 dies també s'obtenen valors inferiors a la densitat sembrada i després de 21 dies no s'arriba ni a doblar la densitat. La comparació entre ambdós substrats mostra diferències estadísticament significatives

després de 14 i 21 dies en cultiu. Així doncs, en base als resultats obtinguts es pot considerar que 0,02 mmol/L és una concentració restrictiva que no garanteix el creixement adient del cultiu, sobretot si la font de Met utilitzada és el DL-HMB.

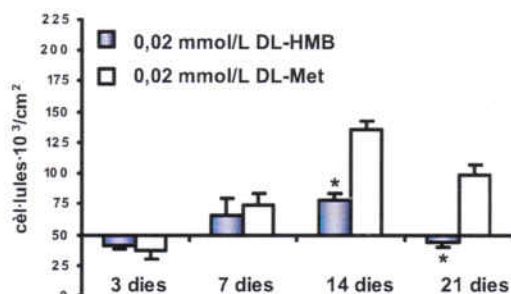


Figura 51. Nombre de cèl·lules Caco-2 viables per superfície de creixement en cultius mantinguts durant 3, 7, 14 i 21 dies en un medi amb 0,02 mmol/L DL-HMB o DL-Met. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 5$ cultius. *Diferències estadísticament significatives entre substrats ($P < 0,05$).

També s'ha assajat les concentracions de 2, 5 i 10 mmol/L DL-HMB o DL-Met (**Figura 52**). Si es comparen ambdues fonts a una concentració de substrat de 2 mmol/L (**Figura 52A**), s'observa un creixement similar després de 3 i 7 dies, mentre que als 14 i 21 dies el nombre de cèl·lules viables és inferior en el cas del DL-HMB. A una concentració de 5 mmol/L (**Figura 52B**), ambdós substrats es diferencien només després de 21 dies, on el nombre de cèl·lules viables és inferior en el cas del DL-HMB. Per últim, a una concentració de 10 mmol/L s'obté un creixement similar i fins i tot superior (14 dies) utilitzant DL-HMB com a font de Met.

Per tal de comparar les diferents concentracions assajades per a un mateix substrat, la **Taula 18** mostra el nombre de cèl·lules obtingudes després de 21 dies. A més, s'adjunta el nombre de cèl·lules viables en absència de qualsevol font de Met (0 mmol/L) durant els 21 dies en cultiu per tal d'avaluar els requeriments relatius de DL-Met i DL-HMB d'aquesta línia cel·lular, així com l'anàlisi estadística de la comparació entre substrats. A la taula, també hi és present el contingut en proteïna dels cultius mantinguts en les diferents condicions. En absència de qualsevol font de Met, s'obtenen els valors més baixos, tant de creixement com de contingut proteic, confirmant-se que aquesta línia cel·lular requereix una font de Met per al seu creixement. En presència de DL-HMB, ambdues variables augmenten fins a la concentració de 2 mmol/L, seguit d'una disminució del creixement i de l'estabilització de la concentració de proteïnes a concentracions més elevades. En presència de DL-Met, s'observa el mateix patró, és a dir, els valors d'ambdues variables augmenten fins assolir un

màxim a 2 mmol/L, seguit d'una disminució tant del creixement com de la concentració proteica a concentracions més elevades. De la comparació entre DL-HMB i DL-Met cal destacar que per assolir un nombre de cèl·lules similar a l'obtingut amb 0,2 mmol/L de DL-Met cal una concentració de 2 mmol/L de DL-HMB, és a dir, 10 vegades superior.

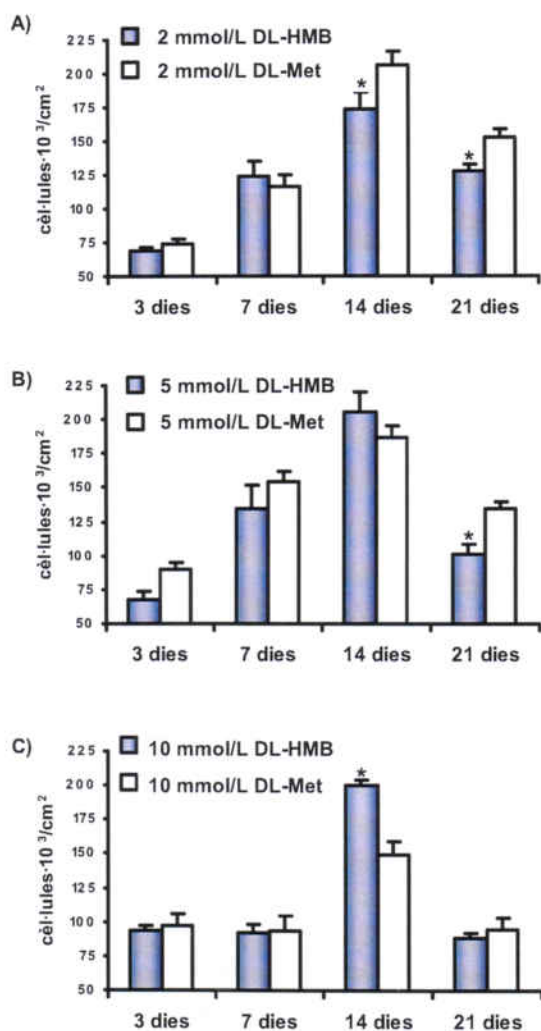


Figura 52. Nombre de cèl·lules Caco-2 viables per superfície de creixement en cultius mantinguts durant 3, 7, 14 i 21 dies en un medi amb 2 (A), 5 (B) i 10 mmol/L (C) DL-HMB o DL-Met. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 13-17$ cultius per 2 mmol/L i $n = 4$ cultius per 5 i 10 mmol/L. *Diferències estadísticament significatives entre substrats ($P < 0,05$).

DL-HMB	cèl·lules·10 ³ /cm ²	µg proteïna/cm ²	DL-Met	cèl·lules·10 ³ /cm ²	µg proteïna/cm ²
0 mmol/L	23,2 ± 2,9 ^a	47,5 ± 2,0 ^a	0 mmol/L	23,2 ± 2,9 ^a	47,5 ± 2,0 ^a
0,02 mmol/L	43,8 ± 3,6 ^b	77,9 ± 5,2 ^b	0,02 mmol/L	98,5 ± 8,7 ^b	117,3 ± 4,6 ^b
0,2 mmol/L	97,9 ± 8,9 ^c	95,1 ± 4,7 ^c	0,2 mmol/L	123,2 ± 6,9 ^c	136,6 ± 4,1 ^c
2 mmol/L	127,3 ± 4,8 ^d	139,2 ± 3,7 ^d	2 mmol/L	153,0 ± 5,4 ^d	152,0 ± 2,0 ^d
5 mmol/L	101,0 ± 6,8 ^c	142,6 ± 4,1 ^d	5 mmol/L	134,1 ± 11,6 ^{c,d}	148,7 ± 5,6 ^d
10 mmol/L	88,6 ± 3,2 ^c	145,4 ± 5,2 ^d	10 mmol/L	94,2 ± 9,6 ^b	134,2 ± 3,4 ^c

cèl·lules·10 ³ /cm ²		DL-HMB				
		0,02 mmol/L	0,2 mmol/L	2 mmol/L	5 mmol/L	10 mmol/L
DL-Met	0,02 mmol/L	+	-	+	-	-
	0,2 mmol/L	+	+	-	+	+
	2 mmol/L	+	+	+	+	+
	5 mmol/L	+	+	-	+	+
	10 mmol/L	+	-	+	-	-

Taula 18. Nombre de cèl·lules Caco-2 viables i µg de proteïna per superfície de creixement en cultius mantinguts durant 21 dies en absència (0 mmol/L) o presència de 0,02 - 0,2 - 2 - 5 - 10 mmol/L DL-HMB o DL-Met com a font de Met. Els resultats corresponents al nombre de cèl·lules viables s'expressen com a mitjana ± ES de n = 5 cultius per 0 i 0,02 mmol/L, n = 20 cultius per 0,2 mmol/L, n = 15 cultius per 2 mmol/L i n = 4 cultius per 5 i 10 mmol/L. Els resultats corresponents a µg proteïna/cm² s'expressen com a mitjana ± ES de n = 4-8 cultius. Les mitjanes senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents dins una mateixa columna (P < 0,05). La comparació estadística entre ambdós substrats s'inclou en forma de taula on el signe positiu (+) indica diferències significatives (P < 0,05) i el signe negatiu (-) indica que no hi ha diferències significatives entre les condicions comparades (P > 0,05).

Per tal de conèixer la possible regulació del transport de les diferents fonts de Met, s'ha estudiat el transport apical de DL-HMB i DL-Met en cèl·lules intestinals Caco-2 mantingudes durant 21 dies en filtres amb diferents fonts de Met en el compartiment apical i amb medi Control en el compartiment basolateral, per tal de simular els canvis en el contingut de la dieta. Atesa la correspondència abans descrita entre 0,2 mmol/L DL-Met i 2 mmol/L DL-HMB i la reducció del creixement amb 0,02 - 5 i 10 mmol/L, els experiments s'han centrat en les concentracions 0,2 i 2 mmol/L. També s'ha inclòs la condició d'absència de font de Met (0 mmol/L) amb finalitats comparatives.

4.2.11. Permeabilitat paracel·lular dels cultius mantinguts en plaques amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met

Com ja s'ha esmentat anteriorment, els estudis de transport en filtres han d'anar precedits d'un estudi de la permeabilitat paracel·lular per tal de comprovar la integritat de l'epiteli en les condicions establertes de manteniment del cultiu. Per aquesta raó, s'ha determinat la TEER i els fluxos de D-mannitol en cèl·lules mantingudes durant 21 dies en filtres amb 0 - 0,2 i 2 mmol/L de DL-HMB o DL-Met com a font de Met. Els resultats (**Figura 53**) mostren que ni la TEER (**Figura 53A**) ni els fluxos de D-mannitol (**Figura 53B**) es veuen afectats per les diferents condicions de creixement assajades. Els resultats, però, suggereixen un augment dels fluxos de D-mannitol en absència d'una font de Met (condició 0 mmol/L), encara que l'anàlisi estadística no ho recolza. Cal tenir present que en el cas de l'estudi de la viabilitat en plaques, la condició 0 mmol/L comporta que l'absència de font de Met és total. En canvi, en el cas de les cèl·lules mantingudes en filtres, les diferents condicions de cultiu només s'han establert per al medi apical amb l'objecte de simular *in vitro* el que serien canvis en el contingut de la dieta de manera que en el compartiment basolateral sempre hi ha hagut medi Control. S'ha dut a terme una prova en la que s'han mantingut els cultius durant 21 dies en absència de font de Met tant al medi apical com basolateral. En aquestes condicions, la TEER es redueix fins a $43,7 \pm 4,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 15$) i els fluxos de D-mannitol incrementen fins a $17.987 \pm 1.250 \text{ fmol}/\mu\text{g}$ proteïna ($n = 4$), confirmant que és necessària una font de Met per mantenir la integritat de l'epiteli.

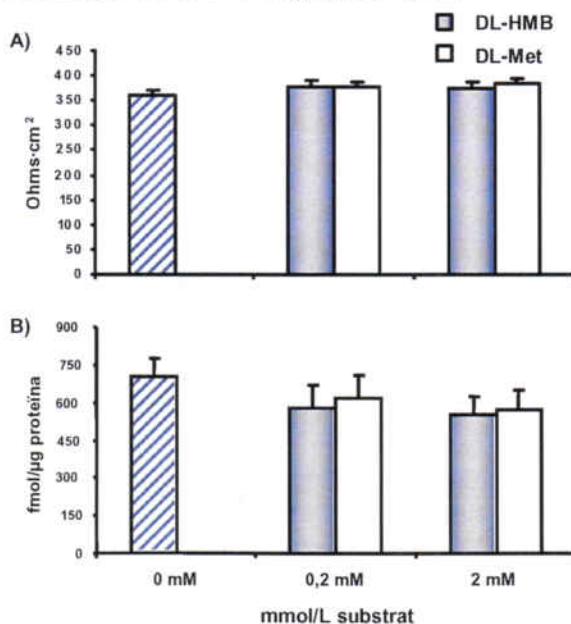


Figura 53. TEER (A) i fluxos de D-mannitol (100 $\mu\text{mol/L}$, 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$) (B) en cèl·lules Caco-2 mantingudes durant 21 dies en absència (0 mmol/L) o presència de 0,2 i 2 mmol/L DL-HMB o DL-Met en el compartiment apical i medi Control en el compartiment basolateral. Els resultats

s'expressen com a mitjana $\pm$ SE de $n = 38$ filtres per la TEER i $n = 6$ filtres per els fluxos de D-mannitol. L'anàlisi estadística no mostra diferències significatives entre les diferents condicions ($P > 0,05$).

4.2.12. Concentració de proteïnes dels cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met

Amb l'objectiu de poder expressar els resultats de transport, s'ha quantificat la concentració de proteïnes en cultius mantinguts amb 0 - 0,2 i 2 mmol/L de DL-HMB o DL-Met com a font de Met després de 21 dies d'incubació. Els resultats (**Taula 19**), només mostren diferències estadísticament significatives entre 0 i 2 mmol/L, tan de DL-HMB com de DL-Met.

$\mu\text{g proteïna}/\text{cm}^2$	DL-HMB	DL-Met
0 mmol/L	$266,9 \pm 7,8^a$	
0,2 mmol/L	$280,5 \pm 7,3^{a,b}$	$288,7 \pm 6,5^{a,b}$
2 mmol/L	$291,9 \pm 3,5^b$	$292,1 \pm 7,0^b$

Taula 19. Concentració de proteïnes per superfície de creixement ($\mu\text{g proteïna}/\text{cm}^2$) en cultius mantinguts durant 21 dies en absència (0 mmol/L) o presència de 0,2 i 2 mmol/L de DL-HMB o DL-Met. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 4$ filtres. Les mitjanes senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents dins una mateixa columna ($P < 0,05$). La comparació estadística entre ambdós substrats per a cada concentració indica que no hi ha diferències significatives ($P > 0,05$).

4.2.13. Transport apical de DL-HMB en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met

El transport apical de DL-HMB (100 $\mu\text{mol/L}$) després de 5 min d'incubació s'ha comparat en cultius mantinguts durant 21 dies en absència (0 mmol/L) o presència de 0,2 i 2 mmol/L DL-HMB o DL-Met com a font de Met en el medi apical i en presència d'un gradient de H^+ (pHa 5,5 - pHb 7,4). Els resultats (**Figura 54**) mostren que no hi ha diferències entre el transport en cèl·lules mantingudes amb DL-HMB, mentre que s'observa un increment progressiu en cèl·lules mantingudes amb DL-Met fins a valors que no difereixen estadísticament dels obtinguts en presència de DL-HMB. La comparació estadística entre substrats a una mateixa concentració posa de manifest diferències només en cèl·lules mantingudes a una concentració 0,2 mmol/L, on el transport en cultius mantinguts amb DL-Met mostra valors més baixos. A més, cal destacar que la condició 0,2 mmol/L DL-Met difereix significativament de la condició 2 mmol/L DL-HMB.

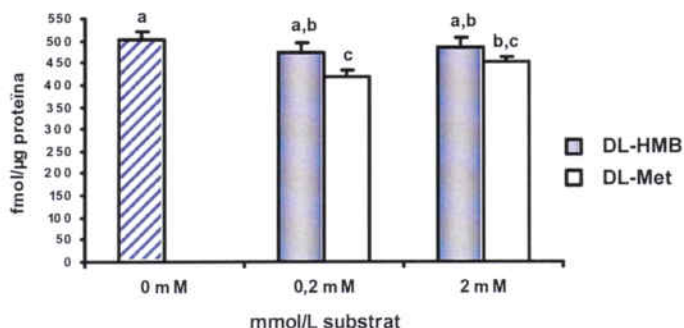


Figura 54. Transport apical de DL-HMB (100 μmol/L, 0,2 μCi/mL) en cultius de cèl·lules Caco-2 mantinguts durant 21 dies en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4) i en absència (0 mmol/L) o presència de 0,2 i 2 mmol/L DL-HMB o DL-Met. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 10$ filtres per a cada condició. Les barres senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents ($P < 0,05$).

Seguidament, s'ha portat a terme un estudi cinètic del transport de DL-HMB en cultius mantinguts amb 2 mmol/L DL-HMB, assumint el mateix component no-medit que en la cinètica portada a terme en cultius mantinguts amb medi Control. Un cop restat el component no-medit al transport total de DL-HMB, el millor ajust per al component mediat és el que considera la participació d'un únic sistema de transport, de baixa afinitat i elevada capacitat (**Figura 55**), amb una K_m de $13,7 \pm 0,03$ mmol/L i una V_{max} de $61,9 \pm 0,12$ pmol/μg proteïna. Si es comparen aquestes dades amb les obtingudes per a la condició Control s'observa que no hi ha diferències significatives en la K_m ($P > 0,05$), mentre que la V_{max} és més gran ($P < 0,05$) quan les cèl·lules són incubades amb 2 mmol/L DL-HMB.

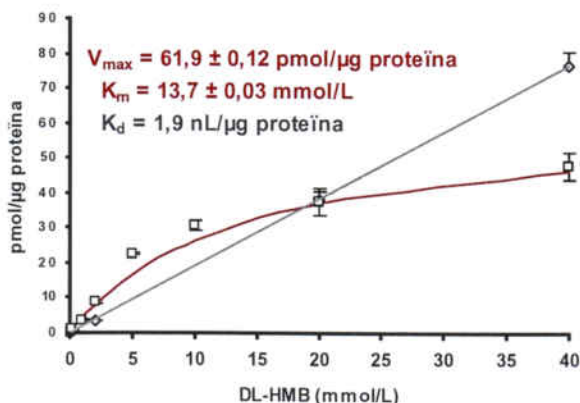


Figura 55. Transport apical de concentracions creixents de DL-HMB (0 – 40 mmol/L, 0,2 μCi/mL) en cèl·lules Caco-2 mantingudes 21 dies amb 2 mmol/L DL-HMB i incubades durant 5 min en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4). El component no-meditat ($\diamond$) s'ha estimat ($R^2 = 0,999$) en presència d'1 mmol/L CHC i s'ha restat del transport total. El millor ajust per el

component mediat (□) és el que considera la participació d'un únic sistema de transport. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres.

4.2.14. Transport apical de DL-Met en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met

El transport de apical de DL-Met (100 μ mol/L) després de 5 min d'incubació s'ha comparat en cultius mantinguts durant 21 dies en absència (0 mmol/L) o presència de 0,2 i 2 mmol/L DL-HMB o DL-Met. Els resultats (**Figura 56**) mostren els valors més elevats en absència de qualsevol font de Met. La resta de condicions no difereix estadísticament, sense que hi hagi diferències entre ambdues fonts de Met.

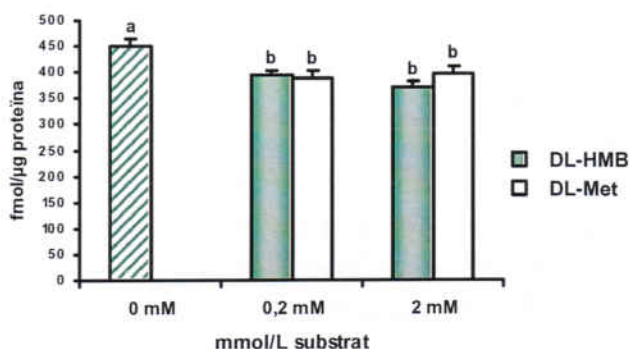


Figura 56. Transport apical de DL-Met (100 μ mol/L, 0,2 μ Ci/mL) en cultius de cèl·lules Caco-2 mantinguts durant 21 dies en presència de gradient de H^+ (pHa 5,5 – pHb 7,4) i en absència (0 mmol/L) o presència de 0,2 i 2 mmol/L DL-HMB o DL-Met. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 10$ filtres per a cada condició. Les barres senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents ($P < 0,05$).

4.2.15. Incorporació de la radioactivitat procedent del DL-HMB o de la DL-Met a les proteïnes cel·lulars al llarg del temps d'incubació

La capacitat de les cèl·lules Caco-2 per convertir el DL-HMB i la DL-Met a L-Met s'ha estudiat de dues formes; a través de la incorporació de la radioactivitat procedent del DL-HMB o de la DL-Met a les proteïnes cel·lulars i a través de l'avaluació de l'activitat de l'enzim D-HADH.

La incorporació de la radioactivitat procedent del DL-HMB o de la DL-Met s'ha avaluat en experiments de transport en els que, un cop transcorregut el temps d'incubació, el filtre es sotmet a precipitació amb TCA i s'analitza la radioactivitat present en diferents fraccions:

- filtre: correspon a la radioactivitat intracel·lular insoluble en TCA i, per tant, a la part incorporada a les proteïnes
- sobrenedant: correspon a la radioactivitat intracel·lular soluble en TCA i, per tant, a la part no incorporada a les proteïnes, és a dir, a la que resta lliure
- filtre + sobrenedant: correspon a la radioactivitat que roman a l'interior de l'enteròcit, ja sigui incorporada a les proteïnes o lliure
- medi basolateral: correspon a la radioactivitat lliure que, un cop acumulada dins la cèl·lula, ha estat transportada a través de la membrana basolateral.

S'ha dut a terme un estudi al llarg del temps d'incubació (5, 15, 30 i 60 min) per tal d'avaluar el perfil del transport i incorporació a les proteïnes (**Taula 20**). Els resultats s'expressen en percentatge respecte al total de substrat transportat a través de l'epiteli, és a dir, respecte la suma de la radioactivitat present en el filtre, sobrenedant i medi basolateral. El percentatge que roman a l'interior de la cèl·lula (filtre + sobrenedant) disminueix al llarg del temps per ambdós substrats, amb la conseqüent disminució del percentatge tant de la radioactivitat incorporada a les proteïnes com de la que resta lliure. En canvi, el percentatge corresponent a la fracció basolateral augmenta significativament al llarg del temps. Si es considera el percentatge de radioactivitat que s'incorpora a les proteïnes (filtre), es pot observar que només mostra diferències estadísticament significatives entre substrats als 15 min d'incubació. Els resultats corresponents al percentatge de radioactivitat que ha quedat acumulada a l'interior de l'enteròcit en forma lliure (sobrenedant) mostren que és significativament més elevat en el cas del DL-HMB, excepte després de 5 min d'incubació. La suma d'ambdós percentatges (filtre + sobrenedant) és més elevada en el cas del DL-HMB, excepte després de 5 min on no s'observen diferències respecte la DL-Met. Per altra banda, els resultats corresponents al percentatge de la radioactivitat present al medi basolateral mostren valors més elevats en el cas de la DL-Met, excepte després de 5 min on no s'observen diferències respecte al DL-HMB. A partir dels resultats obtinguts en aquest estudi al llarg del temps, s'ha escollit un període d'incubació de 30 min per avaluar l'efecte del manteniment dels cultius amb diferents fonts de Met.

% respecte total	Substrat	5 min	15 min	30 min	60 min
Filtre (F)	DL-HMB	7,7 ± 1,0 ^a	5,8 ± 0,5 ^{a,*}	2,3 ± 0,4 ^b	1,9 ± 0,5 ^b
	DL-Met	4,9 ± 0,9 ^a	2,8 ± 0,3 ^{a,b}	2,5 ± 0,2 ^{b,c}	1,3 ± 0,2 ^c
Sobrenedant (SN)	DL-HMB	19,5 ± 6,0 ^a	22,2 ± 0,3 ^{a,*}	12,9 ± 1,8 ^{b,*}	8,5 ± 0,7 ^{b,*}
	DL-Met	19,0 ± 0,3 ^a	6,3 ± 0,2 ^b	3,1 ± 0,5 ^c	2,1 ± 0,3 ^c
F + SN	DL-HMB	27,2 ± 7,1 ^a	28,0 ± 0,2 ^{a,*}	15,2 ± 2,2 ^{b,*}	10,4 ± 1,1 ^{b,*}
	DL-Met	23,9 ± 1,2 ^a	9,1 ± 0,3 ^b	5,6 ± 0,5 ^c	3,4 ± 0,4 ^d
Basolateral	DL-HMB	72,8 ± 7,1 ^a	72,0 ± 0,2 ^{a,*}	84,8 ± 2,2 ^{b,*}	89,6 ± 1,1 ^{b,*}
	DL-Met	76,1 ± 1,2 ^a	90,9 ± 0,3 ^b	94,4 ± 0,5 ^c	96,6 ± 0,4 ^d

Taula 20. Radioactivitat present en el filtre (F), sobrenedant (SN), acumulada a la cèl·lula (F + SN) i en el medi basolateral expressada en tant per cent respecte al total després del transport de DL-HMB i DL-Met (100 µmol/L) en cèl·lules Caco-2 incubades durant 5, 15, 30 i 60 min en presència de gradient de H⁺ (pHa 5,5 – pHb 7,4). Els resultats s'expressen com a mitjana ± ES de n = 3 filtres per a cada condició. *Diferències estadísticament significatives entre substrats (P < 0,05). Les mitjanes senyalitzades amb diferent lletra són significativament diferents dins una mateixa fila (P < 0,05).

4.2.16. Incorporació de la radioactivitat procedent del DL-HMB o de la DL-Met a les proteïnes cel·lulars en culitus mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB o DL-Met

Després de 30 min d'incubació, el percentatge de radioactivitat de les diferents fraccions no varia en cultius mantinguts amb 0 - 0,2 i 2 mmol/L DL-HMB o DL-Met (**Taula 21**). A més, les diferències entre substrats segueixen un perfil similar a l'observat a la Taula 20.

% respecte total	Substrat	0 mmol/L	0,2 mmol/L	2 mmol/L
Filtre (F)	DL-HMB	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,5	2,6 ± 0,4
	DL-Met	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Sobrenedant (SN)	DL-HMB	12,1 ± 1,7*	13,3 ± 2,0*	13,9 ± 0,7*
	DL-Met	3,6 ± 0,3	3,7 ± 0,4	3,3 ± 0,4
F + SN	DL-HMB	13,9 ± 1,9*	15,5 ± 2,4*	16,5 ± 1,0*
	DL-Met	5,8 ± 0,4	5,8 ± 0,3	5,3 ± 0,4
Basolateral	DL-HMB	86,1 ± 1,9	84,5 ± 2,4	83,5 ± 1,0
	DL-Met	94,2 ± 0,4*	94,2 ± 0,3*	94,7 ± 0,4*

Taula 21. Radioactivitat present en el filtre (F), sobrenedant (SN), acumulada a la cèl·lula (F + SN) i en el medi basolateral expressada en tant per cent respecte al total després del transport (30 min) de DL-HMB i DL-Met (100 µmol/L) en cèl·lules Caco-2 mantingudes en presència de gradient de H⁺

(pHa 5,5 – pHb 7,4) i en absència (0 mmol/L) o presència de 0,2 i 2 mmol/L DL-HMB o DL-Met, respectivament. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 3$ filtres per a cada condició.

*Diferències estadísticament significatives entre substrats ($P < 0,05$).

4.2.17. Activitat D-HADH en cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB

Per tal determinar si l'activitat de l'enzim D-HADH varia segons concentració de DL-HMB utilitzada per al creixement del cultiu, s'ha determinat aquesta activitat en cèl·lules mantingudes durant 21 dies amb 0,2 i 2 mmol/L DL-HMB. Els resultats (**Figura 57**) mostren que l'activitat de l'enzim D-HADH augmenta amb la concentració de substrat.

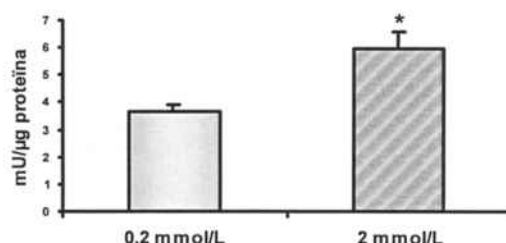


Figura 57. Activitat D-HADH en cultius de cèl·lules Caco-2 mantingudes durant 21 dies amb 0,2 i 2 mmol/L DL-HMB. Els resultats s'expressen com a mitjana $\pm$ ES de $n = 2$ cultius. *Diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$).

5. DISCUSSIÓ



La Met és un aminoàcid limitant en les dietes comercials per a animals de granja basades en blat i soia i, en particular, per als pollastres d'engreix. Així, per tal de cobrir els requeriments d'aquest aminoàcid, és necessari addicionar DL-Met o DL-HMB a la formulació del pinso. L'efectivitat nutricional del DL-HMB respecte a l'aminoàcid encara és subjecte de debat i els treballs realitzats en aquest sentit plantegen diverses hipòtesis per intentar explicar les diferències detectades. L'objectiu general d'aquest treball ha estat, doncs, investigar el paper de l'intestí en la utilització del DL-HMB.

En la seva presentació líquida, el DL-HMB conté una proporció notable de formes no-monomèriques que no són absorbides per l'intestí de pollastre (Saunderson, 1991; Van Weerden *et al.*, 1992) i que, per tant, han d'ésser primer hidrolitzades (Boebel i Baker, 1982; Lemme *et al.*, 2002). Els resultats del present estudi que posen de relleu un increment en el contingut de monòmer en el compartiment mucosal després de la incubació amb DL-HMB suggereixen, doncs, la capacitat d'hidròlisi de l'intestí. Aquests resultats han permès determinar que durant els 30 min d'incubació la mucosa intestinal és capaç d'hidrolitzar entre el 50 i el 60% dels oligòmers. Koban i Koberstein (1984) reporten que la velocitat d'hidròlisi dels dímers en una solució aquosa incrementa linealment amb la concentració de HCl. En canvi, la hidròlisi calculada és similar per a les dues condicions de pH assajades en tots els segments intestinals, fet que suggereix que la participació de la mucosa en aquest procés és molt més significativa que la possible hidròlisi deguda únicament al pH àcid del medi d'incubació. Lawson i Ivey (1986) varen incubar el DL-HMB en un fluid pancreàtic simulat i varen trobar una hidròlisi del 50% després de 30 min d'incubació. A partir d'aquests resultats varen concloure que l'activitat hidrolítica de l'intestí deriva d'un o més enzims procedents de la secreció pancreàtica. A més, en sacs evertits del duodè de pollastre, aquests autors varen trobar que la hidròlisi dels dímers és aproximadament del 70% després d'1 h d'incubació i del 92% després de 2 h d'incubació. Pel que fa als enzims implicats en el procés d'hidròlisi, fins al moment se n'han proposat fins a cinc dels presents en el fluid intestinal (Bruyer *et al.*, 1988; Bruyer i Vanbelle, 1990). Així doncs, els resultats obtinguts en el present treball confirmen la capacitat hidrolítica de la mucosa del duodè descrita per aquests autors i, a més, atorguen una activitat remarcable a la resta de segments de l'intestí prim. Tenint en compte que tant els enzims pancreàtics com els presents a la mucosa intestinal participarien en la hidròlisi del dímer, es pot assumir que la capacitat en condicions fisiològiques ha d'ésser superior a la detectada en condicions *in vitro*.

Per confirmar que la presència de les formes no-monomèriques no és un factor limitant en l'absorció de l'hidroxianàleg, s'ha comparat el transport de DL-HMB, també en sacs

evertits de l'intestí de pollastre, amb el d'un producte que només conté monòmer (DL-HMB-PCM). Els resultats obtinguts no posen de manifest diferències notables, ni en l'acumulació de monòmer en la paret intestinal ni en l'aparició al medi serosal, indicant doncs, que la presència de formes no-monomèriques no en limita l'absorció. A més, en experiments realitzats al laboratori en condicions *in vivo* es va observar tant la capacitat hidrolítica del jejú com la manca de diferències en l'absorció i en la concentració plasmàtica entre el DL-HMB i el DL-HMB-PCM (Martín-Venegas *et al.*, 2006b).

S'ha descrit que el DL-HMB travessa la membrana apical dels enteròcits per difusió simple (Lerner *et al.*, 1969; Knight i Dibner, 1984; Brachet i Puigserver, 1989; Dibner *et al.*, 1992) i per un mecanisme de transport no estereoespecífic, independent de Na^+ (Brachet i Puigserver, 1987 i 1989) i dependent de gradient de H^+ (Maenz i Engele-Schaan, 1996a; Pan *et al.*, 2002). Tenint en compte aquestes característiques, l'estudi del transport en sacs evertits s'ha dut a terme en presència i absència d'un gradient de H^+ . Els resultats posen de relleu que el transport tant de DL-HMB com de DL-HMB-PCM és més favorable a pHm de 5,5 tot confirmant, doncs, la participació d'un sistema de transport dependent de H^+ . Pel que fa al perfil regional, la bibliografia aporta poques dades referents a l'absorció del DL-HMB a l'intestí prim de pollastre. Els resultats de Knight i Dibner (1984) no mostren diferències en l'acumulació de DL-HMB al llarg de l'intestí, encara que uns anys més tard, utilitzant un procediment experimental diferent, Dibner *et al.* (1988) varen trobar que l'absorció és més important en el duodè i en el jejú proximal. En canvi, Pan *et al.* (2002) reporten que el transport de DL-HMB és més elevat en oòcits de *Xenopus laevis* injectats amb l'ARNm de pollastre procedent de les regions més distals de l'intestí prim. En el present estudi s'observa que tant en presència com en absència d'un gradient de H^+ , el duodè és el segment amb uns valors inferiors tant en l'acumulació en el teixit com en l'aparició serosal, mentre que el jejú i l'ili presenten uns valors similars.

Per poder identificar el mecanisme de transport i poder determinar el paper d'aquesta variable en la utilització del DL-HMB, s'ha considerat més adient utilitzar un altre model *in vitro*, el de cultius de cèl·lules intestinals Caco-2. Es tracta d'un model en el que es pot discriminar amb molta facilitat els processos apicals dels basolaterals (Thwaites *et al.*, 1993a i 1993b) i que, a més, és molt utilitzat per estudiar la regulació del transport per components de la dieta (Walker *et al.*, 1998).

En primer lloc, s'ha estudiat la dependència del gradient de H^+ del transport apical de DL-HMB en el cultius de cèl·lules Caco-2 mantinguts en condicions Control. Després de 5 min d'incubació, s'assoleixen, però, els mateixos valors d'acumulació del substrat dins les

cèl·lules en absència i presència d'un gradient imposat de H^+ . Tenint en compte els resultats de la bibliografia i els obtinguts en els sacs evertits de l'intestí de pollastre es va decidir aprofundir en l'estudi de la dependència H^+ .

L'FCCP és un protonòfor que dissipa el gradient de H^+ (Benz i McLaughlin, 1983). Així, els resultats que mostren una inhibició del transport de DL-HMB en presència d'FCCP a pHa de 5,5, suggereixen que el transport està associat al gradient de H^+ . A més, la davallada del pH_i que es produeix en incubar les cèl·lules amb DL-HMB així ho confirmen. El gradient de H^+ a través de la membrana es manté gràcies al bescanviador Na^+/H^+ de la membrana apical (NHE3) que bescanvia Na^+ extracel·lular per H^+ intracel·lular gràcies al gradient electroquímic de Na^+ (Figura 58). Per tant, l'NHE3 és responsable del manteniment del microclima àcid adjacent a la membrana de la vora en raspall i de l'homeòstasi del pH_i (Orlowski i Grinstein, 2004). Així doncs, l'NHE3 seria el responsable del manteniment del gradient de H^+ necessari per al funcionament dels sistemes dependents de H^+ (Gonda *et al.*, 1999; Thwaites *et al.*, 1999) i per tant també, de la recuperació del pH_i que s'observa en retirar el substrat del medi d'incubació. Els resultats del registre del pH_i mostren a més, com en presència d'EIPA, un inhibidor específic de l'NHE3, les cèl·lules no poden recuperar les condicions de pH_i inicials. Aquests resultats indiquen, doncs, que el DL-HMB es cotransporta amb H^+ i que l'activitat de l'NHE3 és fonamental per al manteniment del gradient de H^+ a través de la membrana apical. Per tant, la hipòtesi plantejada per explicar la manca de diferències entre les condicions de pH establertes seria que en 5 min d'incubació l'NHE3 és capaç de generar i mantenir el gradient de H^+ necessari per al transport.

La capacitat de l'FCCP per inhibir el transport de DL-HMB a pHa de 7,4 així com la inhibició del transport obtinguda amb EIPA a pHa de 5,5 i 7,4 donen suport a aquesta possibilitat. Per aquesta raó, s'ha provat l'efecte del pH a un temps més curt d'incubació on se suposa que l'NHE3 disposa de menys temps per generar el gradient de H^+ . De fet, Anderson *et al.* (2004) ja varen observar, en aquest mateix model experimental, que l'activitat de l'NHE3 es posa de manifest sobretot a temps llargs d'incubació quan el gradient imposat pot haver-se dissipat com a conseqüència de l'activitat de transport. Els resultats obtinguts confirmen aquesta hipòtesi ja que després d'1 min d'incubació, el transport de DL-HMB és significativament més petit a un pHa de 7,4. A més, a pHa de 5,5 la contribució de l'NHE3 és aparentment inapreciable atès que l'EIPA no exerceix cap efecte sobre el transport.

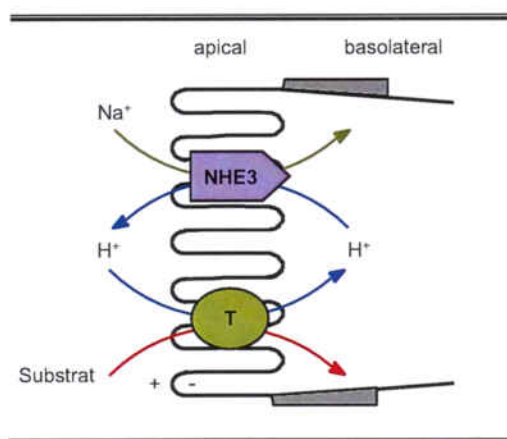


Figura 58. Esquema de la cooperació funcional entre un sistema dependent de H^+ (T) i el bescanviador NHE3.

Els resultats on s'observa una reducció del transport en retirar el Na^+ del medi d'incubació confirmen també la contribució de l'NHE3 en el transport del DL-HMB. Anderson *et al.* (2004) i Thwaites *et al.* (2002) descriuen per als sistemes dependents de H^+ PAT1 i PepT1, una cooperació funcional amb l'NHE3 que comporta la dependència parcial de Na^+ (Rubino *et al.*, 1971; Himukai *et al.*, 1978; Kennedy *et al.*, 2002) ja que en absència d'aquest ió, l'activitat del bescanviador està reduïda. Aquesta dependència de Na^+ es posa de manifest a temps llargs d'incubació quan és més necessària l'activitat de l'NHE3 per mantenir el gradient de H^+ (Anderson *et al.*, 2004). Per al sistema MCT1, un altre candidat per mediar el transport de DL-HMB, també s'ha descrit aquest tipus de cooperació amb l'NHE3 (Okamura *et al.*, 2002).

En els experiments realitzats en sacs evertits, també s'observa que l'acumulació de monòmer en la paret intestinal és més favorable en presència de Na^+ , però només quan està associat a la imposició d'un gradient de H^+ , fet que confirmaria també la participació del bescanviador en el transport de l'hidroxianàleg a l'intestí prim de pollastre. En aquest sentit, ha estat descrita la presència d'activitat NHE, funcionalment semblant a NHE3 a la membrana apical de l'intestí de pollastre (Bhartur *et al.*, 1997). A més, la manca d'efecte del gradient de Na^+ en absència d'un gradient de H^+ confirma les dades de Brachet i Puigserver (1989) que descriuen el sistema de transport del DL-HMB a pH de 7,4 com a un sistema independent de Na^+ .

Pel que fa a la identificació del mecanisme implicat en el transport de DL-HMB a través de la membrana apical, s'ha considerat la possible participació dels sistemes de transport

PAT1, PepT1 i MCT1. Es tracta de sistemes dependents de H^+ , que s'expressen a la membrana apical tant de les cèl·lules Caco-2 com de l'intestí (Thwaites *et al.*, 1993a; Buyse *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003) i mostren uns requeriments estructurals que *a priori* són compatibles amb el reconeixement del DL-HMB (Döring *et al.*, 1998; Boll *et al.*, 2003; Halestrap i Meredith, 2004). Els resultats obtinguts en els experiments d'inhibició *cis* descarten però, la participació del sistema PAT1 en el transport de DL-HMB. Aquests resultats concorden amb els obtinguts per Foltz *et al.* (2004) que observen com la substitució del grup amino de la L-alanina per un grup hidroxil (per formar L-lactat), redueix la capacitat del PAT1 per unir-se al substrat. A més, en el cas del DL-HMB, el seu corresponent aminoàcid, la Met, no és reconeguda pel sistema PAT1 (Thwaites *et al.*, 1995). Els resultats de la inhibició *cis* amb Gly-Sar també permeten excloure la participació del sistema PepT1. Tot i que el substrat més petit reconegut per aquest sistema és l'àcid 5-aminopentanoic (Döring *et al.*, 1998), amb una certa similitud estructural al DL-HMB, la presència d'un grup metiltio en C4 o de l'hidroxil en C2 podrien ésser responsables de la incapacitat de PepT1 per reconèixer el DL-HMB. En canvi, els resultats dels experiments realitzats amb inhibidors (floretila i CHC) i substrats (L-lactat, piruvat, β -hidroxibutirat i butirat) específics del sistema MCT1, suggereixen la interacció del DL-HMB amb aquest transportador. Abans que el sistema MCT1 fos identificat, Brachet i Puigserver (1989) ja havien observat a l'intestí de pollastre, la inhibició del transport de DL-HMB amb α -cianocinnamat (el CHC n'és un derivat), L-lactat, propionat i piruvat. A més, Friedrich *et al.* (1991) també varen descriure a l'intestí de conill, la inhibició mútua entre el L-lactat i l'hidroxianàleg de la L-leucina. Aquests autors descriuen el transport dels hidroxianàlegs com a no-estereoselectiu. El sistema MCT1 només és estereoselectiu per àcids monocarboxílics substituïts en C2 com l'àcid làctic i mandèlic (Carpenter i Halestrap, 1994; Tamai *et al.*, 1995; Ogihara *et al.*, 1996). Així, el fet que en les cèl·lules Caco-2 no s'hagi observat cap efecte del D-lactat sobre el transport de DL-HMB confirma l'estereoselectivitat descrita per aquest sistema. Atès, però, que no ha estat possible disposar dels dos isòmers del DL-HMB per separat, els resultats obtinguts no permeten extreure cap conclusió sobre l'estereoselectivitat del sistema MCT1 per a aquest hidroxianàleg.

Aparentment, doncs, les característiques del transport de DL-HMB senyalen al sistema MCT1 com el responsable del seu transport a través de la membrana apical de les cèl·lules Caco-2. Per confirmar la contribució de l'NHE3 en el transport de DL-HMB, s'ha considerat necessari descartar la possibilitat que el sistema MCT1 pugui funcionar també en absència de gradient de H^+ ja que la inhibició del transport a pHa de 7,4 amb CHC i L-lactat sembla confirmar aquesta possibilitat. En aquestes condicions, però, i amb l'NHE3 completament inhibït (EIPA i absència de Na^+), el CHC és incapaç de produir una inhibició addicional del

transport per la qual cosa es confirma que la capacitat per transportar DL-HMB a pH de 7,4 és deguda únicament a la contribució del bescanviador NHE3. De fet, els estudis de Brachet i Puigserver (1987 i 1989), on descriuen un sistema de transport compartit amb el L-lactat, estan realitzats a un pH de 7,4 tot i que ja suggereixen la possible contribució del gradient de H^+ .

Per tal d'acabar de confirmar que el mecanisme implicat en el transport del DL-HMB és el sistema MCT1 s'ha dut a terme un estudi cinètic de la interacció de l'hidroxianàleg amb el transport de L-lactat, un dels substrats preferits d'aquest sistema de transport (Halestrap i Meredith, 2004). Els resultats de la cinètica de Dixon posen de manifest que es tracta d'una inhibició de tipus competitiva, és a dir, que ambdós substrats s'uneixen al mateix *locus* del transportador, amb una K_i de $17,5 \pm 0,11$ mmol/L. A l'intestí prim de pollastre, Brachet i Puigserver (1989) també descriuen que la interacció del L-lactat amb el transport de L-HMB és de tipus competitiva. A més, considerant que els substrats que actuen com a inhibidors competitius tenen uns valors de K_i pròxims als seus valors de K_m (Poole i Halestrap, 1993), la K_i calculada per al DL-HMB dóna una idea de l'afinitat del sistema MCT1 per a l'hidroxianàleg. En aquest sentit, l'anàlisi cinètic del transport de DL-HMB indica la participació d'un únic sistema de transport de baixa afinitat ($K_m = 13,1 \pm 0,04$ mmol/L) i elevada capacitat ($V_{max} = 43,6 \pm 0,14$ pmol/ μ g proteïna), confirmant-se doncs les característiques d'afinitat que es deriven de la K_i . Els valors de la constant de Michaelis obtinguts per al DL-HMB són superiors als del L-lactat ($K_m = 3-5$ mmol/L) però de l'ordre dels descrits per al β -hidroxibutirat ($K_m = 10-12$ mmol/L) (Halestrap i Meredith, 2004). Tanmateix, en vesícules aïllades de la membrana apical de l'intestí prim de pollastre, Brachet i Puigserver (1989) i Maenz i Engele-Schaan (1996a) calculen uns valors de K_m per al transport de L-HMB més petits ($1,7$ i $1,13$ mmol/L, respectivament). En canvi, Friedrich *et al.* (1991) calculen un valor de $15,4$ mmol/L per a la K_m per al transport de l'hidroxianàleg de la leucina en vesícules procedents de l'intestí prim de conill. Els resultats obtinguts en l'estudi cinètic són compatibles, doncs, amb les característiques descrites prèviament per al sistema MCT1.

La caracterització del sistema de transport per al DL-HMB descarta, doncs, *a priori* la interacció de l'hidroxianàleg i la DL-Met amb a un mateix transportador. Tanmateix, i atès que les dietes suplementades amb DL-HMB també contenen Met procedent dels cereals, s'ha investigat una possible interacció mútua que permetés explicar la menor bioeficàcia descrita per al DL-HMB. En aquest sentit, Brachet i Puigserver (1989) descriuen en experiments d'inhibició *cis*, realitzats a l'intestí de pollastre a pH de 7,4, que el transport de DL- i L-HMB no es veu afectat per la presència de D-Met. De forma similar, a l'intestí de rata

tampoc detecten cap efecte del DL-HMB sobre el transport de L-Met (Brachet i Puigserver, 1987). En les cèl·lules Caco-2, no s'ha detectat cap efecte de la L- i D-Met sobre el transport de DL-HMB en presència d'un gradient de H^+ mentre que, en aquestes condicions experimentals, sí que s'ha observat una reducció significativa tant del transport de L- com de D-Met en presència de DL-HMB. Arrel d'aquests resultats, es varen repetir els experiments en absència de gradient de H^+ i les dades confirmen els resultats de Brachet i Puigserver (1987 i 1989). Així doncs, la interacció entre ambdós substrats es produiria només en presència d'un gradient de H^+ . A més, l'estudi d'aquesta interacció en absència de gradient de Na^+ indica que la interacció es produeix únicament amb un component del transport de L- o D-Met dependent de H^+ i independent de Na^+ . La comparació dels resultats de la condició Control de la Figura 43 amb els de la Figura 44, confirmen la participació en el transport de L- i D-Met d'un component dependent de Na^+ , tant en presència com en absència de gradient de H^+ ($P < 0.05$ per a les condicions Control NaCl vs ChoCl tant a pHa de 5,5 com de 7,4). Els resultats, però, també suggereixen la participació d'un component dependent de H^+ que no havia estat descrit prèviament.

Així doncs, s'ha procedit en primer lloc a determinar la participació dels sistemes MCT1 i PAT1 en la interacció amb el component del transport de L-Met sensible al gradient de H^+ . La contribució del sistema MCT1 s'ha descartat ja que el L-lactat i el CHC no afecten el transport de L-Met. A més, el DL-HMB és capaç d'inhibir el transport de L-Met en absència d'activitat MCT1 (inhibició amb CHC). També s'ha descartat la participació del sistema PAT1 en el transport de L-Met, confirmant els resultats previs de Thwaites *et al.* (1995), ja que ni la betaïna ni la D-prolina afecten el transport de l'aminoàcid. Per aquesta raó, s'ha considerat la possibilitat que la interacció es produeixi amb algun dels sistemes de transport dependents o independents de Na^+ descrits prèviament per a la L-Met que s'activés per la presència d'un gradient de H^+ .

En el transport de L-Met a la membrana apical de l'intestí de pollastre, el component dependent de Na^+ està mediat pel sistema B (Brachet i Puigserver, 1987; Maenz i Engele-Schann, 1996a; Soriano-García *et al.*, 1998) i el component independent de Na^+ pels sistemes, $b^{0,+}$, y^+ i L (Soriano-García *et al.*, 1998). En cèl·lules Caco-2, Chen *et al.* (1994) també descriuen a més, la participació del sistema $B^{0,+}$. Així doncs, s'han considerat com a possibles candidats cinc sistemes de transport: B, $B^{0,+}$, $b^{0,+}$, y^+ i L. La discriminació entre aquests sistemes s'ha dut a terme tenint en compte l'especificitat de cadascun d'ells. Els sistemes B, $B^{0,+}$ i L són sensibles al BCH (Stevens *et al.*, 1984; Sloan i Magger, 1999) i l'activitat dels sistemes $B^{0,+}$, $b^{0,+}$ i y^+ es pot inhibir per la presència d'un aminoàcid catiónic. Els resultats que posen de manifest que el DL-HMB no pot inhibir el component del transport

de L-Met insensible a L-lisina descarten que la interacció es produeixi amb els sistemes B i L. De la mateixa forma, el DL-HMB no és capaç d'inhibir el component del transport de L-Met insensible a BCH, descartant-se doncs la participació dels sistemes $b^{0,+}$ i y^+ . Així, seria el sistema $B^{0,+}$, sensible a L-lisina i BCH, el responsable de la interacció del DL-HMB amb el transport de L-Met. Atès que el nombre de sistemes de transport per a la L-Met és molt elevat s'ha provat l'efecte del DL-HMB sobre el transport de Tau que és transportada pels sistemes TauT (Moyer *et al.*, 1988; Roig-Pérez *et al.*, 2005), PAT1 (Thwaites i Stevens, 1999) i $B^{0,+}$ (Van Winkle *et al.*, 1985). Els resultats confirmen que la interacció del DL-HMB només es produeix en presència de gradient de H^+ i que el component inhibid per l'hidroxianàleg correspon al mediat pel sistema $B^{0,+}$ ja que la inhibició observada és molt similar a l'obtinguda amb BCH. A més, en presència d'ambdós DL-HMB i BCH no s'obté cap efecte addicional. En el cas de la inhibició del DL-HMB sobre el transport de D-Met, atès que també és transportada pel sistema $B^{0,+}$ (Hatanaka *et al.*, 2002), es pot considerar que estaria mediada també per aquest transportador. Encara que hi ha molts exemples de sistemes de transport sensibles al pH (Shotwell *et al.*, 1981; Barker i Ellory, 1990; Muñoz *et al.*, 1992; Hirayama *et al.*, 1994; Munck i Munck, 1999; Bröer *et al.*, 2004), fins al moment no ha estat descrit cap efecte d'activació sobre el sistema $B^{0,+}$. Cal tenir en compte però, que mentre el sistema B, responsable de l'absorció intestinal de la major part dels aminoàcids neutres (Kekuda *et al.*, 1997), és un transportador constitutiu, el sistema $B^{0,+}$ es considera induïble i sensible a la modulació (Ray *et al.*, 2003).

La caracterització cinètica de la inhibició del DL-HMB sobre el transport de L-Met revela que es tracta d'una interacció acompetitiva. Aquest tipus d'inhibició es caracteritza per la unió de l'inhibidor al complex transportador-substrat, impeding-se així la translocació a través de la membrana. La presència d'un inhibidor d'aquest tipus redueix tant la V_{max} del substrat com el seu valor de K_m , de manera que el DL-HMB reduiria tant la capacitat com l'afinitat del sistema $B^{0,+}$ per a la L-Met. Així, la menor eficàcia nutricional descrita per al DL-HMB podria explicar-se, si més no en part, per la seva interacció amb el sistema $B^{0,+}$ que reduiria l'absorció intestinal de L-Met. Per tal de provar-ho, s'han fet uns experiments on s'ha estudiat l'efecte d'una concentració relativa d'ambdós substrats més pròxima a la de la composició del pinso (L-Met:DL-HMB, 2:1). En aquests experiments s'ha mantingut la concentració de la L-Met a 0,1 mmol/L i s'ha reduït la concentració de DL-HMB de 20 fins a 0,05 mmol/L. Així, amb un proporció de L-Met:DL-HMB de 2:1, la inhibició del transport no és significativa (4,4%, $P > 0,05$) i s'ha trobat un efecte significatiu a partir d'una proporció 1:1 (8%, $P < 0,05$).

Pel que fa a la comparació del transport de DL-HMB amb el de la L- i D-Met, no s'observen diferències significatives ($P > 0,05$) entre el DL-HMB i la L-Met a pH de 5,5, mentre que els valors de DL-HMB són més elevats a pH de 7,4 ($P < 0,05$), essent els valors per a la D-Met els més baixos ($P < 0,05$). Els experiments de transport realitzats amb DL-Met com a substrat, revelen uns valors intermedis als obtinguts amb L- i D-Met ($P > 0,05$, respecte als dos estereoisòmers). Dibner *et al.* (1992) i Richards *et al.* (2005) no detecten grans diferències en el transport de DL-HMB i DL-Met a l'intestí de pollastre i Zheng *et al.* (1994) també observen en cèl·lules Caco-2, valors de transport més petits per la D-Met que per la L-Met. En canvi, Brachet i Puigserver (1989) observen una K_m similar per a la L-Met en comparació amb L-HMB però una V_{max} quatre vegades superior per a l'aminoàcid. Tanmateix, en comparar el transport de l'hidroxianàleg amb el de la DL-Met, aquestes diferències es redueixen (Brachet i Puigserver, 1989). Maenz i Engele-Schaan (1996a) també detecten major afinitat i capacitat per la L-Met en comparació amb el L-HMB i una afinitat i capacitat inferior per a la D-Met.

El següent objectiu ha estat estudiar la possible regulació del transport tant de DL-HMB com de DL-Met pel contingut d'aquestes dues fonts de Met en el medi de cultiu, per tal de simular el que seria l'aportació amb la dieta. Atès que la composició del medi pot alterar la proliferació i diferenciació del cultiu, primer s'ha estudiat el creixement dels cultius mantinguts amb diferents concentracions de DL-HMB i DL-Met. La disminució del nombre de cèl·lules viables en absència de qualsevol font de Met (condició 0 mmol/L) posa de relleu la seva necessitat per al creixement de les cèl·lules intestinals Caco-2. Usami *et al.* (1991) reporten resultats similars i demostren que les cèl·lules Caco-2 mantingudes en absència de Met queden arrestades en la fase G_0/G_1 del cicle cel·lular. En aquest sentit, s'ha descrit que l'homocisteïna, metabòlit de la Met, estimula la proliferació de cèl·lules Caco-2 amb un efecte dependent de la dosi (Akoglu *et al.*, 2004). Així doncs, la reducció del nombre de cèl·lules observat en condicions de baixa disponibilitat d'una font de Met, podria ésser deguda a la reducció de la producció d'aquest metabòlit. A més, la privació de Met causa una ràpida inhibició de la síntesi d'ARN i d'ADN mentre que la síntesi de proteïnes tendeix a augmentar (Tisdale, 1980). En les cèl·lules Caco-2, s'ha calculat la quantitat de proteïna per cèl·lula i els resultats posen de manifest valors més elevats en absència de qualsevol font de Met que en les altres condicions experimentals (2 respecte a 1-1,6 ng/cèl·lula segons la condició de cultiu).

Els resultats de viabilitat obtinguts amb una concentració 0,02 mmol/L de DL-HMB o DL-Met posen de manifest la limitació del creixement del cultiu, sobretot en el cas del DL-HMB. La comparació, a 0,2 mmol/L de substrat, revela un major creixement per la DL-Met mentre

que l'activitat sacarasa no difereix entre DL-HMB i DL-Met. Els resultats també posen de manifest que per obtenir un creixement similar a l'obtingut amb 0,2 mmol/L DL-Met cal una concentració 10 vegades superior de DL-HMB (2 mmol/L). En aquest sentit, Schreiner i Jones (1987) descriuen que per obtenir el mateix creixement en cultius de fibroblasts de porc en un medi amb 1 mmol/L L-Met cal 7,5 mmol/L de DL-HMB. Aquests autors conclouen, a més, que aquestes cèl·lules poden créixer en presència de D-HMB però no de L-HMB i descriuen un creixement equivalent per 1 mmol/L de L-Met i 3,75 mmol/L de D-HMB. Amb posterioritat, aquests autors (Schreiner i Jones, 1988) atribueixen el menor creixement dels fibroblasts amb L-HMB a un menor transport respecte al D-HMB. L'equivalència entre el creixement obtingut amb DL-Met i L-Met en cèl·lules Caco-2 suggereix que la D-Met és substancialment convertida a KMB, i per tant, a L-Met.

En presència de concentracions superiors a 2 mmol/L, ambdues fonts de Met mostren una davallada en el nombre de cèl·lules viables. En aquest sentit, Usami *et al.* (1991) també observen una inhibició del creixement de cèl·lules limfoides SLC a partir d'una concentració de Met d'1 mmol/L i fins a 10 mmol/L. Així, la disminució del nombre de cèl·lules viables a 5 i 10 mmol/L de substrat suggereix que la toxicitat de la Met descrita prèviament (Harper *et al.*, 1970) es posa de manifest també en cèl·lules intestinals Caco-2. Els estudis referents a la toxicitat de l'hidroxianàleg (Griminger i Fisher, 1968; Katz i Baker, 1975) conclouen que, a la mateixa concentració de substrat, el DL-HMB mostra menor toxicitat que l'aminoàcid. Aquesta podria ésser la raó per la qual la davallada del nombre de cèl·lules a concentracions elevades de DL-HMB no és tan pronunciada com en el cas de la DL-Met.

La bibliografia reporta pocs estudis referents al mecanisme que expliqui l'efecte tant de la privació com de l'excés de Met en un model intestinal com el de les cèl·lules Caco-2. Sembla ésser, però, que el GSH, metabòlicament lligat a la Met, juga un paper important ja que s'ha descrit que en cèl·lules Caco-2 després de 24 h de privació de nutrients en el medi apical, els nivells de GSH i GSSG es redueixen (Le Bacquer *et al.*, 2003) i que el manteniment del balanç GSH/GSSG afecta de manera molt important al creixement d'aquestes cèl·lules (Jonas *et al.*, 2003). Per altra banda, en cultius d'hepatòcits de rata, l'addició de Met o Cys a concentracions elevades provoca un increment de l'activitat cisteïna dioxigenasa en paral·lel amb una reducció de l'activitat γ -glutamilcisteïna sintasa més marcada en presència de Met que de Cys (Kwon i Stipanuk, 2001). Així, l'increment de l'activitat cisteïna dioxigenasa s'associa a un increment en la síntesi de Tau en relació al catabolisme per formar sulfat (Bagley i Stipanuk, 1995; Bella i Stipanuk, 1995; Bella *et al.*, 1999) mentre que la disminució de l'activitat γ -glutamilcisteïna sintasa provoca a una reducció en la síntesi de GSH (Bagley i Stipanuk, 1995; Bella i Stipanuk, 1995).

Un cop determinat l'efecte de les diferents fonts de Met sobre el creixement, s'ha estudiat el transport en cultius mantinguts en aquestes condicions però descartant les concentracions de 5 i 10 mmol/L, atès l'efecte tòxic observat. Per portar a terme aquest estudi, les cèl·lules s'han sembrat en filtres per tal de poder simular l'aportació de la dieta tot variant la concentració de la font de Met en el compartiment apical. Així, s'han mantingut els cultius durant 21 dies amb 0 - 0,2 i 2 mmol/L DL-HMB o DL-Met en el medi apical i amb medi Control (0,2 mmol/L L-Met) en el medi basolateral, ja que en condicions fisiològiques sigui quina sigui la composició del contingut luminal, l'enteròcit sempre pot disposar de la L-Met de la circulació sistèmica. Els estudis de viabilitat cel·lular en cultius mostren que el creixement de les cèl·lules intestinals Caco-2 en plaques està notablement afectat per la concentració i font de Met utilitzada. En el cas dels cultius en filtres, les cèl·lules es sembren a una densitat més elevada per garantir que totes les àrees de la monocapa arriben a la confluència aproximadament al mateix temps (Le Ferrec *et al.*, 2001). Per tant, totes les cèl·lules es troben en el mateix estadi de diferenciació i l'expressió dels sistemes de transport és homogènia. Behrens i Kissel (2003) observen que la densitat de sembra no modifica la permeabilitat paracel·lular, però sí que afecta l'estructura i l'expressió dels sistemes de transport de la membrana. Les diferències observades en la concentració de proteïna dels cultius mantinguts en plaques amb les diferents fonts de Met no s'observen en els mantinguts en filtres. Només en el cas de la condició 0 mmol/L s'observen valors inferiors a la concentració de 2 mmol/L tant de DL-HMB com de DL-Met. A més, per tal de garantir la integritat de l'epiteli s'ha determinat també la permeabilitat paracel·lular a través de la TEER i dels fluxos de D-mannitol. Aquestes variables també són indicatives de l'estat de diferenciació de les unions estretes i el fet que no es vegin afectades per les condicions de cultiu és indicatiu que la diferenciació de l'epiteli tampoc ho està. Per totes aquestes raons, les possibles diferències observades en el transport en les diferents condicions de cultiu es poden atribuir a la regulació del sistema de transport i no a canvis en el creixement i diferenciació de l'epiteli.

El transport de nutrients a través de la membrana apical de l'enteròcit es pot modificar, entre altres factors, per canvis en el contingut de la dieta (Ferraris i Diamond, 1989; Shirazi-Beechey *et al.*, 1995). El patró de regulació difereix, però, segons el substrat i la seva aportació a través de la dieta (Diamond i Karasov, 1987; Ferraris i Diamond, 1989). La hipòtesi general de regulació adaptativa que descriuen aquests autors prediu una regulació per increment en el cas de nutrients no essencials, mentre que per als nutrients essencials potencialment tòxics, s'espera també una regulació per increment però només fins a garantir l'aportació adequada per tal de reduir el risc d'intoxicació (Diamond i Karasov, 1987; Ferraris i Diamond, 1989). En aquest sentit, la suplementació de la dieta amb L-lisina, provoca una

regulació per increment del seu transport (Torras-Llort *et al.*, 1998) mentre que la suplementació amb L-fenilalanina, L-tirosina o L-Met, aminoàcids potencialment tòxics (Harper *et al.*, 1970), indueix una regulació per decrement del seu propi transport (Wapnir *et al.*, 1972; Soriano-García *et al.*, 1999).

Els cultius mantinguts en filtres en absència de qualsevol font de Met en el medi apical mostren uns valors de transport de DL-HMB i DL-Met més elevats en comparació amb les altres condicions, essent aquest increment més pronunciat en el cas del transport de DL-Met. Aquests resultats es podrien associar a una regulació per increment del transport per intentar garantir l'aportació de l'aminoàcid. El transport de DL-Met no mostra diferències entre els cultius mantinguts amb 0,2 i 2 mmol/L, tal i com preveu la hipòtesi de la regulació adaptativa abans esmentada, atesa la toxicitat de la DL-Met. En canvi, el transport de DL-HMB és més gran, per a les dues concentracions assajades, en els cultius mantinguts amb DL-HMB. La caracterització cinètica del transport de DL-HMB en cultius mantinguts amb 2 mmol/L DL-HMB posa de manifest un augment de la V_{max} sense canvis en la K_m , respecte als resultats cinètics obtinguts en cultius mantinguts amb medi Control (0,2 mmol/L L-Met). Aquesta regulació per increment afectaria, per tant, a l'activitat del sistema MCT1 i confirmaria la menor toxicitat atribuïda al DL-HMB respecte a la DL-Met. Cuff *et al.* (2002) posen de manifest un increment en l'expressió d'aquest transportador en cèl·lules epitelials de còlon en cultiu (AA/C1) induïda per la presència de butirats en el medi de cultiu, que està mediada per un increment de 5 vegades la V_{max} sense canvis en la K_m si bé l'addició d'acetat o propionat al medi no produeix cap efecte.

La conversió de DL-HMB en L-Met és un procés en dues etapes que inclou la participació de diferents enzims (Dibner i Knight, 1984). El D-HMB és oxidat a KMB per l'enzim D-HADH, localitzat en la fracció mitocondrial de diferents teixits, incloent-hi la mucosa intestinal (Knight i Dibner, 1984). La determinació de l'activitat D-HADH en cèl·lules Caco-2 augmenta amb la concentració de DL-HMB present en el medi de cultiu, suggerint la regulació de l'activitat d'aquest enzim pel contingut de la dieta. En aquest sentit, s'ha descrit que l'activitat de l'enzim D-AAOX, responsable de la conversió de D-Met en KMB, també es regula en el fetge de rata a través del contingut proteic de la dieta (Carreira *et al.*, 1996). El fet que l'enzim L-HAOX, responsable de l'oxidació de L-HMB, no s'hagi descrit a l'intestí de pollastre (Gordon i Sizer, 1965; Dibner i Knight, 1984; Dibner i Ivey, 1991) podria ésser indicatiu de que aquest estereoisòmer no és convertit a L-Met i podria explicar que el requeriment de DL-HMB en cèl·lules Caco-2 sigui 10 vegades superior al de la DL-Met per obtenir un creixement cel·lular similar.

En una segona etapa, el KMB format es transamina per donar lloc a L-Met. En pollastres, s'ha descrit que aquesta reacció no constitueix el pas limitant en la conversió del DL-HMB en L-Met (Harter i Baker, 1977; Knight i Dibner, 1984; Rangel-Lugo i Austic, 1998), atès que una àmplia varietat de transaminases poden catalitzar aquesta reacció (Rangel-Lugo i Austic, 1998). Encara que el fetge és l'òrgan on es realitza la major part d'aquesta conversió, el ronyó i l'intestí prim, d'entre altres, també participen en el metabolisme del DL-HMB (Gordon i Sizer, 1965; Langer, 1965; Dupuis *et al.*, 1989 i 1990; Dibner i Ivey, 1992; McCollum *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2001). En aquest sentit, s'ha descrit que el KMB és intermediari en altres reaccions metabòliques però, a l'intestí de pollastre, la formació de L-Met és la via preferent en el seu metabolisme (Brachet i Puigserver, 1992). Els resultats del present treball posen de manifest una notable conversió de DL-HMB en L-Met durant la seva absorció a l'intestí prim de pollastre. A més, tenint en compte que l'aparició de Met, després de la incubació amb DL-HMB, és més elevada en presència d'un gradient de H^+ , es pot establir una relació directa entre el transport de DL-HMB i la seva conversió a nivell intestinal.

Els aminoàcids L-Met, L-Cys i Tau estan metabòlicament relacionats per la via de la transulfuració. Cal tenir en compte, a més, que per al pollastre la L-Cys és un aminoàcid sofert molt relacionat amb els requeriments nutricionals de Met (Nutrient Requirements of Poultry, 1994). Els estudis que valoren la variació del contingut de L-Cys i Tau en l'organisme per canvis en la dieta conclouen que el fetge és l'òrgan on s'observen els canvis més importants (Ide *et al.*, 2002; Stipanuk *et al.*, 2002) tot i que també cal tenir en compte la contribució d'altres teixits no hepàtics (Stipanuk *et al.*, 2002). De fet, la transulfuració no només es realitza en el fetge, sinó també en el ronyó, intestí prim i pàncreas (Finkelstein, 1998). L'estudi de l'aparició serosal d'aminoàcids sofrats en sacs evertits s'ha portat a terme per avaluar la conversió de DL-HMB en L-Met, L-Cys i Tau i, per tant, la seva disponibilitat sistèmica. Els resultats indiquen que l'aparició serosal de Cys i Tau difereix segons la font de Met utilitzada i atribueixen un paper nutricional rellevant al metabolisme intestinal dels aminoàcids sofrats. En aquest sentit, s'ha descrit que les cèl·lules intestinals de rata són molt actives en el metabolisme de la L-Cys atès que nivells elevats d'aquest aminoàcid afecten negativament la seva viabilitat (Coloso i Stipanuk, 1989). A més, Bella i Stipanuk (1995) reporten una major formació de Tau respecte a sulfat en el catabolisme hepàtic de la L-Cys per tal de minimitzar l'acidificació per excés d'aminoàcids sofrats a la dieta. Així doncs, encara que s'ha descrit que la desviació de la L-Cys a la síntesi de Tau a l'intestí és menor que en el fetge (Coloso i Stipanuk, 1989), la incubació amb un àcid orgànic com el DL-HMB dóna lloc a uns valors més elevats de Tau en comparació amb els obtinguts després de la incubació amb L-Met. La Tau és l'aminoàcid lliure intracel·lular més abundant

(O'Flaherty, 1997) i posseeix moltes funcions de protecció cel·lular (Wright *et al.*, 1986; Huxtable, 1992; Lambert, 2004). Entre elles, cal destacar la seva capacitat osmoreguladora (Wright *et al.*, 1986; Huxtable, 1992; Shimizu i Satsu, 2000). Tenint en compte que l'epiteli intestinal rep fluids hiperosmòtics (Mongin, 1976), els nivells elevats de Tau després de la incubació amb DL-HMB podrien contribuir favorablement en el manteniment homeostàtic en períodes postprandials.

L'anàlisi regional de l'aparició de Met després de la incubació amb DL-HMB no reporta diferències entre els diferents segments intestinals. Tanmateix, si es té en compte que l'aparició de DL-HMB en el duodè mostra els valors més baixos, els resultats podrien suggerir que la capacitat de conversió del duodè és relativament més elevada. No hi ha cap referència bibliogràfica al respecte però els resultats es correlacionen amb l'estudi de Brachet i Puigserver (1992) on s'observa que l'activitat de l'enzim D-AAOX, responsable de l'oxidació de la D-Met a KMB, és quantitativament més elevada a la mucosa duodenal. A més, tot i que l'aparició de Cys no difereix entre els diferents segments intestinals, els valors de l'aparició de Tau són significativament més baixos en el duodè. Així, en el cas de la Tau s'observa el mateix perfil regional que el descrit per l'aparició de DL-HMB, fet que confirma la relació entre el transport i la conversió de l'hidroxianàleg a l'intestí de pollastre. Els resultats també revelen que la suma de la Met, Cys i Tau en el compartiment serosal de sacs incubats amb DL-HMB revela una conversió de l'hidroxianàleg en aminoàcids sofrats del 71, 59 i 63% al duodè, jejú i ili, respectivament. Aquests percentatges confirmen tant l'elevada capacitat intestinal per convertir el DL-HMB a aminoàcids sofrats com la notable participació del duodè en aquest procés.

L'epiteli intestinal és un sistema altament dinàmic, amb molts processos de proliferació i diferenciació ja que es renova contínuament. Així doncs, els aminoàcids absorbits a partir de la dieta han de cobrir la síntesi de proteïnes per tal de mantenir la integritat de la mucosa intestinal (Dudley *et al.*, 1998; Stoll *et al.*, 2000). L'intestí és el responsable de metabolitzar una part important d'aquests aminoàcids (Wu *et al.*, 1996; Stoll *et al.*, 1998), obtenint-ne així una fracció important d'energia (Wu, 1998) sobretot a partir del catabolisme de la glutamina (Windmueller i Spaeth, 1980). A més, el grau en que els aminoàcids que provenen de la dieta s'utilitzen en el metabolisme de primer pas determinarà la seva disponibilitat per a la resta de l'organisme. Per aquesta raó, s'ha quantificat l'aparició d'aminoàcids no-sofrats al compartiment serosal en resposta a la incubació amb DL-HMB o L-Met. Els resultants obtinguts no mostren diferències entre ambdós substrats, de manera que la incubació amb diferents fonts de Met no compromet la disponibilitat d'altres aminoàcids. D'acord amb el

present treball, Song *et al.* (2001) descriuen que la perfusió de DL-Met o DL-HMB només afecta el metabolisme hepàtic de Met i no el d'altres aminoàcids.

Una altra variable determinada en el present treball ha estat la incorporació de L-Met a les proteïnes cel·lulars segons la font de Met utilitzada. Els resultats posen de manifest que als 5 min d'incubació ja s'ha produït la incorporació de la radioactivitat procedent del DL-HMB i de la DL-Met a les proteïnes cel·lulars i que, per tant, la conversió de DL-HMB en L-Met en aquestes cèl·lules durant aquest període és significativa. A més, els resultats indiquen que a tots els temps assajats, el percentatge de radioactivitat que s'incorpora a les proteïnes després de la incubació amb DL-HMB és similar i, fins i tot, superior a l'obtinguda amb DL-Met. En aquest sentit, també s'ha descrit una incorporació similar per ambdós substrats a les proteïnes hepàtiques (Gordon i Sizer, 1965; Dibner i Ivey, 1992; Knight *et al.*, 1998). A més, els resultats indiquen que els cultius mantinguts en absència o presència de diferents concentracions de DL-HMB i DL-Met no difereixen en el percentatge d'incorporació a les proteïnes per a cada substrat, suggerint doncs que aquesta variable no és un factor limitant en la utilització del DL-HMB.

D'altra banda, el percentatge de radioactivitat present en el medi basolateral suggereix que, majoritàriament, el DL-HMB i la DL-Met són transportats vectorialment cap a aquest compartiment. Després de 5 min d'incubació, la distribució dels percentatges no difereix entre ambdós substrats. En canvi, en comparar-los a temps d'incubació més llargs, s'observa que la proporció de DL-Met transportada al compartiment basolateral és més gran que en el cas del DL-HMB que roman acumulat a l'interior de les cèl·lules majoritàriament en forma lliure. L'estudi de Saunderson (1985) també mostra una major radioactivitat en forma lliure per al DL-HMB i ho relaciona amb una menor capacitat del DL-HMB per convertir-se en L-Met respecte la DL-Met. Una altra possibilitat podria ésser que la permeabilitat de la membrana basolateral limités la sortida del substrat en el cas de cèl·lules incubades amb DL-HMB tal i com és el cas del transport transepitelial de L-Met i de Tau (Chen *et al.*, 1994; Roig-Pérez *et al.*, 2005).

Dels resultats obtinguts en el present treball es poden extreure, per a cadascun dels objectius plantejats, les següents conclusions:

I. Determinar si el contingut en formes no-monomèriques és un factor limitant en l'absorció del DL-HMB a l'intestí prim de pollastre

- El contingut en formes no-monomèriques no constitueix un factor limitant en el transport del DL-HMB en sacs evertits de duodè, jejú i ili de pollastre ja que la mucosa presenta una elevada capacitat per hidrolitzar aquestes formes (entre un 50 i un 60% dels dímers). A més, no s'han observat diferències entre el transport de DL-HMB i el d'un compost que només conté monòmer (DL-HMB-PCM).
- Els resultats permeten confirmar la dependència de H^+ del transport de l'hidroxianàleg descrita prèviament i suggereixen la participació del bescanviador Na^+/H^+ (NHE). La dependència de H^+ és més accentuada en les regions més distals de l'intestí prim on, a més, s'observen els valors més elevats d'acumulació en el teixit i d'aparició serosal.

II. Avaluar la conversió del DL-HMB en L-Met i posterior metabolització a L-Cys i Tau a l'intestí prim de pollastre

- Els resultats permeten correlacionar el transport intestinal de l'hidroxianàleg amb la seva conversió en L-Met. La formació de L-Cys i Tau a partir de DL-HMB és més elevada que a partir de L-Met essent aquests resultats indicatius de la desviació de l'hidroxianàleg cap a la via de la transulfuració.
- La conversió del DL-HMB en aminoàcids sofrats és del 71, 59 i 63% en el duodè, jejú i ili, respectivament. Aquests resultats confereixen a l'intestí un paper important en el metabolisme d'aquestes fonts de Met i atribueixen una notable participació del duodè en aquest procés.

III. Caracteritzar i identificar el sistema de transport del DL-HMB a la membrana apical en cèl·lules intestinals Caco-2

- El transport de DL-HMB a la membrana apical de les cèl·lules Caco-2 està mediat per un sistema de baixa afinitat i alta capacitat que, per la seva especificitat, s'ha identificat amb el sistema MCT1. A més, els resultats confirmen la cooperació funcional d'aquest transportador amb el bescanviador NHE3 de la membrana apical.
- En presència de gradient de H^+ , el DL-HMB interacciona acompetitivament amb el transport de L- i D-Met, aparentment a través del sistema $B^{0,+}$.

IV. Estudiar la regulació del transport de DL-HMB pel contingut de la dieta en DL-HMB i DL-Met en el model *in vitro* de cèl·lules Caco-2

- El contingut de DL-HMB en el compartiment apical posa en marxa un mecanisme de regulació adaptativa per increment mediat per un canvi en la V_{max} del sistema MCT1.
- En aquest estudi també s'ha pogut observar que els requeriments de DL-HMB per al creixement dels cultius són 10 vegades superiors que per la DL-Met.

V. Avaluar la utilització del DL-HMB a través de la seva conversió en L-Met i incorporació a proteïnes en cèl·lules Caco-2

- Les cèl·lules Caco-2 presenten activitat D-HADH, confirmant-se així la capacitat de l'intestí per convertir el D-HMB a L-Met. A més, els resultats mostren que l'activitat d'aquest enzim incrementa amb la disponibilitat de DL-HMB com a substrat.
- La incorporació a la síntesi de proteïnes de la L-Met formada a partir de DL-HMB és similar a l'obtinguda amb DL-Met com a substrat i és independent del contingut en el compartiment apical de la font de Met.
- El DL-HMB i la DL-Met acumulats dins la cèl·lula, gràcies als sistemes de transport de la membrana apical, són majoritàriament transportats cap al compartiment basolateral. Tanmateix, la sortida relativa de DL-Met a través de la membrana

basolateral és més elevada respecte al DL-HMB ja que l'hidroxianàleg s'acumula en forma lliure dins la cèl·lula. La distribució d'ambdós substrats no depèn del contingut de la font de Met en el compartiment apical.

A partir dels objectius assolits s'obren noves qüestions que suggereixen futures línies de continuïtat en la investigació sobre la utilització del DL-HMB com a font de Met:

- El transport a través de la membrana apical aparentment no és el factor limitant en l'absorció intestinal del DL-HMB atesa l'elevada capacitat de la mucosa per hidrolitzar les formes no-monomèriques, la manca de diferències en el transport de DL-HMB i DL-Met, així com la regulació per increment del transport de l'hidroxianàleg. Caldria, però, confirmar la participació del sistema MCT1 i la seva regulació pel contingut de la dieta a l'intestí de pollastre. També caldria comprovar, en aquesta espècie animal, la interacció del DL-HMB amb el transport de DL-Met en condicions que reflecteixin la composició del pinso.
- Pel que fa a la conversió i posterior metabolisme del DL-HMB, els resultats confereixen a l'intestí una elevada contribució en aquests processos. Tanmateix, la conversió en L-Met no és completa, de manera que altres òrgans com el fetge i el ronyó haurien de garantir-ne la resta. En aquest sentit, tot i que la incorporació de l'hidroxianàleg com a L-Met a les proteïnes cel·lulars no sembla ésser un factor limitant, caldria investigar la raó per la qual les cèl·lules intestinals requereixen més DL-HMB que DL-Met per al seu creixement.
- Finalment, també seria interessant caracteritzar el mecanisme responsable de la sortida del DL-HMB a través de la membrana basolateral ja que podria contribuir a la menor eficàcia nutricional descrita per al DL-HMB.

A

Abe M, Okada H, Matsumura D, Sato H, Funaba M i Iriki T (2000). Methionine imbalance and toxicity in calves. *J Anim Sci* 78:2722-2730.

Acar N, Barbato GF i Patterson PH (2001). II. The effect of feeding excess methionine on live performance, carcass traits, and ascitic mortality. *Poult Sci* 80:1585-1589.

Akoglu B, Milovic V, Caspary WF i Faust D (2004). Hyperproliferation of homocysteine-treated colon cancer cells is reversed by folate and 5-methyltetrahydrofolate. *Eur J Nutr* 43:93-99.

Andersen V i Munck BG (1987). Transport of the alpha-amino-mono-carboxylic acid L-alanine by the beta-alanine carrier of the rabbit ileum. *Biochim Biophys Acta* 902:145-148.

Anderson CM, Grenade DS, Boll M, Foltz M, Wake KA, Kennedy DJ, Munck LK, Miyauchi S, Taylor PM, Campbell FC, Munck BG, Daniel H, Ganapathy V i Thwaites DT (2004). H⁺/amino acid transporter 1 (PAT1) is the imino acid carrier: An intestinal nutrient/drug transporter in human and rat. *Gastroenterology* 127:1410-1422.

Andrýs R, Klecker D, Zeman L i Marecek E (2003). The effect of changed pH values of feed in isophosphoric diets on chicken broiler performance. *Czech J Anim Sci* 48:197-206.

Armstrong J (1964). The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biochim Biophys Acta* 86:194-197.

Artursson P, Palm K i Luthman K (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 46:27-43.

B

Babu E, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim do K, Iribe Y, Tangtrongsup S, Jutabha P, Li Y, Ahmed N, Sakamoto S, Anzai N, Nagamori S i Endou H (2003). Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J Biol Chem* 278:43838-43845.

Bagley PJ i Stipanuk MH (1995). Rats fed a low protein diet supplemented with sulfur amino acids have increased cysteine dioxygenase activity and increased taurine production in hepatocytes. *J Nutr* 125:933-940.

Baker DH, Becker DE, Norton HW, Jensen AH i Harmon BG (1966). Quantitative evaluation of the tryptophan, methionine and lysine needs of adult swine for maintenance. *J Nutr* 89:441-447.

Baker DH (1976). Utilization of methionine analogues. *J Nutr* 106:1376-1377.

Barker GA i Ellory JC (1990). The identification of neutral amino acid transport systems. *Exp Physiol* 75:3-26.

Barnes DM, Calvert CC i Klasing KC (1995). Methionine deficiency decreases protein accretion and synthesis but not tRNA acylation in muscles of chicks. *J Nutr* 125:2623-2630.

Battezzati A i Riso P (2002). Amino acids: fuel, building blocks for proteins, and signals. *Nutrition* 18:773-774.

Behrens I i Kissel T (2003). Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? *Eur J Pharm Sci* 19:433-442.

Bella DL i Stipanuk MH (1995). Effects of protein, methionine, or chloride on acid-base balance and on cysteine catabolism. *Am J Physiol* 269:E910-E917.

Bella DL, Kwon YH i Stipanuk MH (1996). Variations in dietary protein but not in dietary fat plus cellulose or carbohydrate levels affect cysteine metabolism in rat isolated hepatocytes. *J Nutr* 126:2179-2187.

Bella DL i Stipanuk MH (1996). High levels of dietary protein or methionine have different effects on cysteine metabolism in rat hepatocytes. *Adv Exp Med Biol* 403:73-84.

Bella DL, Hahn C i Stipanuk MH (1999). Effects of nonsulfur and sulfur amino acids on the regulation of hepatic enzymes of cysteine metabolism. *Am J Physiol* 277:E144-E153.

Benevenga NJ i Harper AE (1967). Alleviation of methionine and homocystine toxicity in the rat. *J Nutr* 93:44-52.

- Benevenga NJ** (1984). Evidence for alternative pathways of methionine catabolism. *Adv Nutr Res* 6:1-18.
- Benz R i McLaughlin S** (1983). The molecular mechanism of action of the proton ionophore FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone). *Biophys J* 41:381-398.
- Bhartur SG, Bookstein C, Musch MW, Boxer R, Chang EB i Rao MC** (1997). An avian sodium-hydrogen exchanger. *Comp Biochem Physiol A* 118:883-889.
- Boebel KP i Baker DH** (1982). Efficacy of methionine peptides as determined by chick bioassay. *J Nutr* 112:1130-1132.
- Boll M, Foltz M, Rubio-Aliaga I, Kottra G i Daniel H** (2002). Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *J Biol Chem* 277:22966-22973.
- Boll M, Foltz M, Anderson CM, Oechsler C, Kottra G, Thwaites DT i Daniel H** (2003). Substrate recognition by the mammalian proton-dependent amino acid transporter PAT1. *Mol Membr Biol* 20:261-269.
- Boll M, Daniel H i Gasnier B** (2004). The SLC36 family: proton-coupled transporters for the absorption of selected amino acids from extracellular and intracellular proteolysis. *Pflügers Arch* 447:776-779.
- Brachet P, Alvarado F i Puigserver A** (1987). Kinetic evidence for separate systems in transport of D- and L-methionine by rat small intestine. *Am J Physiol* 252:G320-G324.
- Brachet P i Puigserver A** (1987). Transport of methionine hydroxyl analog across the brush border membrane of rat jejunum. *J Nutr* 117:1241-1246.
- Brachet P i Puigserver A** (1989). Na⁺-independent and nonstereospecific transport of 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid by brush border membrane vesicles from chick small intestine. *Comp Biochem Physiol B* 94:157-163.
- Brachet P i Puigserver A** (1992). Regional differences for the D-amino acid oxidase-catalysed oxidation of D-methionine in chicken small intestine. *Comp Biochem Physiol B* 101:509-511.

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

Bröer A, Deitmer JW i Bröer S (2004). Astroglial glutamine transport by system N is upregulated by glutamate. *Glia* 48:298-310.

Brosnan JT (2003). Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr* 133:2068S-2072S.

Bruyer DC, Vanbelle M i Baudichau A (1988). Hydrolysis of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid dimer in simulated intestinal fluid. *Proceeding of the International Symposium of Budapest. Biotechnology and Food Industry, Budapest, Hungary.* pp 163-172.

Bruyer DC i Vanbelle M (1990). Efficacité compare pour la croissance du poussin de différentes sources de methionine. *Ann Zootech* 39:45-51.

Buyse M, Sitaraman SV, Liu X, Bado A i Merlin D (2002). Luminal leptin enhances CD147/MCT-1 mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco2-BBE. *J Biol Chem* 277:28182-28190.

C

Cai J i Jones DP (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome C loss. *J Biol Chem* 273:11401-11404.

Cammack R (1969). Assay, purification and properties of mammalian D-2-Hydroxy Acid Dehydrogenase. *Biochem J* 115:55-64.

Canellakis ES i Tarver H (1953). The metabolism of methyl mercaptan in the intact animal. *Arch Biochem Biophys* 42:446-455.

Carew LB, Evarts KG i Alster FA (1998). Growth, feed intake, and plasma thyroid hormone levels in chicks fed dietary excesses of essential amino acids. *Poult Sci* 77:295-298.

Carpenter L i Halestrap AP (1994). The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lettre tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF. *Biochem J* 304:751-760.

Carreira S, Brun-Achirou D, Brachet P i Puigserver A (1996). Hepatic and renal D-amino acid oxidase activities in the growing rat after ten days of protein undernutrition and refeeding. *Reprod Nutr Dev* 36:73-82.

Case GL i Benevenga NJ (1976). Significance of formate as an intermediate in the oxidation of the methionine, S-methyl-L-cysteine and sarcosine methyl carbons to CO₂ in the rat. *J Nutr* 107:1665-1676.

Chang WK, Yang KD i Shaio MF (1999). Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clin Exp Immunol* 117:482-488.

Chen J, Zhu Y i Hu M (1994). Mechanisms and kinetics of uptake and efflux of L-methionine in an intestinal epithelial model (Caco-2). *J Nutr* 124:1907-1916.

Chen NH, Reith ME i Quick MW (2004). Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflügers Arch* 447:519-531.

Chen Z, Fei YJ, Anderson CM, Wake KA, Miyauchi S, Huang W, Thwaites DT i Ganapathy V (2003). Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. *J Physiol* 546:349-361.

Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K i McCann PP (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 10:471-480.

Chillaron J, Estevez R, Mora C, Wagner CA, Suessbrich H, Lang F, Gelpí JL, Testar X, Busch AE, Zorzano A i Palacin M (1996). Obligatory amino acid exchange via systems b^{0,+}-like and y⁺L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J Biol Chem* 271:17761-17770.

Cohen HP, Choitz HC i Berg CP (1958). Response of rats to diets high in methionine and related compounds. *J Nutr* 64:555-569.

Coloso RM i Stipanuk MH (1989). Metabolism of cyst(e)ine in rat enterocytes. *J Nutr* 119:1914-1924.

Cooper AJ (1983). Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem* 52:187-222.

Cristensen HN (1990). Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 70:43-77.

Cuff MA, Lambert DW i Shirazi-Beechey SP (2002). Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol* 539:361-371.

D

Dahlqvist A (1964). Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 7:18-25.

Daniel H i Kottra G (2004). The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflügers Arch* 447:610-618.

Devés R, Angelo S i Chávez P (1993). N-ethylmaleimide discriminates between two lysine transport systems in human erythrocytes. *J Physiol* 468:753-766.

Diamond JM i Karasov WH (1987). Adaptive regulation of intestinal transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2242-2245.

Dibner JJ (1983). Utilization of supplemental methionine sources by primary cultures of chick hepatocytes. *J Nutr* 113:2116-2123.

Dibner JJ i Knight CD (1984). Conversion of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid to L-methionine in the chick: a stereospecific pathway. *J Nutr* 114:1716-1723.

Dibner JJ, Knight CD, Swick RA i Ivey FJ (1988). Absorption of ¹⁴C-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid (Alimet) from the hindgut of the broiler chick. *Poult Sci* 67:1314-1321.

Dibner JJ, Atwell CA i Ivey FJ (1992). Effect of heat stress on 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid and DL-methionine absorption measured *in vitro*. *Poult Sci* 71:1900-1910.

Dibner JJ i Ivey FJ (1992). Capacity in the liver of the broiler chick for conversion of supplemental methionine activity to L-methionine. *Poult Sci* 71:700-708.

Döring F, Will J, Amasheh S, Clauss W, Ahlbrecht H i Daniel H (1998). Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J Biol Chem* 273:23211-23218.

Drew MD, Van Kessel AG i Maenz DD (2003). Absorption of methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid in conventional and germ-free chickens. *Poult Sci* 82:1149-1153.

Dudley MA, Wykes LJ, Dudley AW, Burrin DG, Nichols BL, Rosenberger J, Jahoor F, Heird WC i Reeds PJ (1998). Parenteral nutrition selectively decreases protein synthesis in the small intestine. *Am J Physiol* 274:G131-G137.

Dupuis L, Saunderson CL, Puigserver A i Brachet P (1989). Oxidation of methionine and 2-hydroxy 4-methylthiobutanoic acid stereoisomers in chicken tissues. *Br J Nutr* 62:63-75.

Dupuis L, Brachet P i Puigserver A (1990). Oxidation of the supplemental methionine source L-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid by pure L-2-hydroxy acid oxidase from chicken liver. *J Nutr* 120:1171-1178.

Duranton B, Freund JN, Galluser M, Schleiffer R, Gosse F, Bergmann C, Hasselmann M i Raul F (1999). Promotion of intestinal carcinogenesis by dietary methionine. *Carcinogenesis* 20:493-497.

E

Edmonds MS i Baker DH (1987). Amino acid excesses for young pigs: effects of excess methionine, tryptophan, threonine or leucine. *J Anim Sci* 64:1664-1671.

Eloranta TO i Kajander EO (1984). Catabolism and lability of S-adenosyl-L-methionine in rat liver extracts. *Biochem J* 224:137-144.

Emmert JL, Garrow TA i Baker DH (1996). Hepatic betaine-homocysteine methyltransferase activity in the chicken is influenced by dietary intake of sulfur amino acids, choline and betaine. *J Nutr* 126:2050-2058.

Enerson BE i Drewes LR (2003). Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *J Pharm Sci* 92:1531-1544.

Esteve-García E i Austic RE (1993). Intestinal absorption and renal excretion of dietary methionine sources by the growing chicken. *J Nutr Biochem* 4:576-587.

Esteve-García E i Llauradó LL (1997). Performance, breast meat yield and abdominal fat deposition of male broiler chickens fed diets supplemented with DL-methionine or DL-methionine hydroxy analogue free acid. *Br Poult Sci* 38:397-404.

F

Featherston WR i Horn GW (1974). Studies on the utilization of the α -hydroxy acid of methionine by chicks fed crystalline amino acid diets. *Poult Sci* 53:680-686.

Ferraris RP i Diamond J (1989). Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates. *Ann Rev Physiol* 51:125-141.

Ferraris RP (1994). Regulation of intestinal nutrient transport. *Physiology of the Intestinal Tract*. Ed. Johnson, Raven Press (New York) pp. 1821-1844.

Ferruzza S, Ranaldi G, Di Girolamo M i Sambuy Y (1995). The transport of lysine across monolayers of human cultured intestinal cells (Caco-2) depends on Na(+)-dependent and Na(+)-independent mechanisms on different plasma membrane domains. *J Nutr* 125:2577-2585.

Finkelstein A i Benevenga NJ (1984). Developmental changes in the metabolism of 3-methylthiopropionate in the rat. *J Nutr* 114:1622-1629.

Finkelstein JD i Mudd SH (1967). Trans-sulfuration in mammals. The methionine-sparing effect of cystine. *J Biol Chem* 242:873-880.

Finkelstein JD, Harris BJ, Martin JJ i Kyle WE (1982). Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary methionine. *Biochem Biophys Res Commun* 108:344-348.

Finkelstein JD i Martin JJ (1984). Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* 32:385-389.

Finkelstein JD (1990). Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1:228-237.

Foltz M, Boll M, Raschka L, Kottra G i Daniel H (2004). A novel bifunctionality: PAT1 and PAT2 mediate electrogenic proton/amino acid and electroneutral proton/fatty acid symport. *FASEB J* 18:1758-1760.

Friedrich M, Murer H i Berger EG (1991). Transport of L-leucine hydroxy analogue and L-lactate in rabbit small-intestinal brush-border membrane vesicles. *Pflügers Arch* 418:393-399.

G

Ganapathy ME, Brandsch M, Prasad PD, Ganapathy V i Leibach FH (1995). Differential recognition of beta-lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J Biol Chem* 270:25672-25677.

Gaull GE i Gaitonde MK (1967). A study of the sulphur amino acids of rat tissues. *Biochem J* 102:294-303.

Gill RK, Saksena S, Alrefai WA, Sarwar Z, Goldstein JL, Carroll RE, Ramaswamy K i Dudeja PK (2005). Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J Physiol* 289:C846-C852.

Gonda T, Maouyo D, Rees SE i Montrose MH (1999). Regulation of intracellular pH gradients by identified Na/H exchanger isoforms and a short-chain fatty acid. *Am J Physiol* 276:G259-G270.

Gordon RS i Sizer IW (1965). Conversion of methionine hydroxy analogue to methionine in the chick. *Poult Sci* 44:673-678.

Griminger P i Fisher H (1968). Methionine excess and chick growth. *Poult Sci* 47:1271-1273.

H

Hadjiagapiou C, Schmidt L, Dudeja PK, Layden TJ i Ramaswamy K (2000). Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol* 279:G775-G780.

Hafez YS, Chavez E, Vohra P i Kratzer FH (1978). Methionine toxicity in chicks and poults. *Poult Sci* 57:699-703.

Halestrap AP i Meredith D (2004). The SLC16 gene family – from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Arch* 447:619-628.

Han Y, Castanon F, Parsons CM i Baker DH (1990). Absorption and bioavailability of DL-methionine hydroxy analog compared to DL-methionine. *Poult Sci* 69:281-287.

Han Y i Baker DH (1993). Effects of excess methionine or lysine for broilers fed a corn-soybean meal diet. *Poult Sci* 72:1070-1074.

Harper AE, Benevenga NJ i Wohlhueter RM (1970). Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol Rev* 50:428-558.

Harter JM i Baker DH (1977). Sulfur amino acid activity of glutathione, DL- α -hydroxymethionine, and α -keto-methionine in chicks. *Proc Soc Exp Biol Med* 156:201-204.

Harter JM i Baker DH (1978). Factors affecting methionine toxicity and its alleviation in the chick. *J Nutr* 108:1061-1070.

Hatanaka T, Huang W, Nakanishi T, Bridges CC, Smith SB, Prasad PD, Ganapathy ME i Ganapathy V (2002). Transport of D-serine via the amino acid transporter ATB(0,+)
expressed in the colon. *Biochem Biophys Res Commun* 291:291-295.

Heby O, Holm I i Persson L (1991). Polyamine-mediated control of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase expression in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 18:1084-1087.

Hidalgo IJ, Raub TJ i Borchardt RT (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96:736-749.

Himukai M, Suzuki Y i Hoshi T (1971). Intestinal transport of amino acid residues of dipeptides. I. Influx of the glycine residue of glycyl-L-proline across mucosal border. *J Biol Chem* 246:3542-3548.

Hinton A, Buhr RJ i Ingram KD (2000). Reduction of *Salmonella* in the crop of broiler chickens subjected to feed withdrawal. *Poult Sci* 72:786-793.

Hirayama BA, Loo DD i Wright EM (1994). Protons drive sugar transport through the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *J Biol Chem* 269:21407-21410.

Hopper AF, Rose PM i Wannemacher RW (1972). Cell population changes in the intestinal mucosa of protein-depleted or starved rats. II. Changes in cellular migration rates. *J Cell Biol* 53:225-230.

Huxtable RJ (1992). Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72:101-163.

I

Ide T, Kushiro M, Takahashi Y, Shinohara K i Cha S (2002). mRNA expression of enzymes involved in taurine biosynthesis in rat adipose tissues. *Metabolism* 51:1191-1197.

J

Jackson VN i Halestrap AP (1996). The kinetics, substrate, and inhibitor specificity of the monocarboxylate (lactate) transporter of rat liver cells determined using the fluorescent intracellular pH indicator, 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein. *J Biol Chem* 271:861-868.

Jaenisch R i Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33:245-254.

Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF i Mansel RE (1998). Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 244:414-420.

Jonas CR, Ziegler TR, Gu LH i Jones DP (2002). Extracellular thiol/disulfide redox state affects proliferation rate in a human colon carcinoma (Caco2) cell line. *Free Radic Biol Med* 33:1499-1506.

K

Kanai Y i Hediger MA (2004). The glutamate/neutral amino acid transporter family SCL1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflügers Arch* 447:469-479.

Katz RS i Baker DH (1975). Toxicity of various organic sulfur compounds for chicks fed crystalline amino acid diets containing threonine and glycine at their minimal dietary requirements for maximal growth. *J Anim Sci* 41:1355-1361.

Kaufman N, Klavins JV i Kinney TD (1966). Methionine deficiency and iron retention in the rat. *Br J Nutr* 20:813-817.

Kekuda R, Torres-Zamorano V, Fei YJ, Prasad PD, Li HW, Mader LD, Leibach FH i Ganapathy V (1997). Molecular and functional characterization of intestinal Na(+)-dependent neutral amino acid transporter B⁰. *Am J Physiol* 272:G1463-G1472.

Kennedy DJ, Leibach FH, Ganapathy V i Thwaites DT (2002). Optimal absorptive transport of the dipeptide glycylsarcosine is dependent on functional Na⁺/H⁺ exchange activity. *Pflügers Arch* 445:139-146.

Kleinman WA i Richie JP (2000). Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochem Pharmacol* 60:19-29.

Knight CD i Dibner JJ (1984). Comparative absorption of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid and L-methionine in the broiler chick. *J Nutr* 114:2179-2186.

Knight CD, Wuelling CW, Atwell CA i Dibner JJ (1994). Effect of intermittent periods of high environmental temperature on broiler performance responses to sources of methionine activity. *Poult Sci* 73:627-639.

Knight CD, Atwell CA, Wuelling CW, Ivey FJ i Dibner JJ (1998). The relative effectiveness of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid and DL-methionine in young swine. *J Anim Sci* 76:781-787.

Koban HB i Koberstein E (1984). Kinetic of the hydrolysis of dimeric and trimeric methionine hydroxyl analogue free acid under conditions of pH and temperature. *J Agric Food Chem* 32:393-396.

Koelkebeck KW, Parsons CM, Leeper RW i Moshtaghian J (1991). Effect of protein and methionine levels in molt diets on postmolt performance of laying hens. *Poult Sci* 70:2063-2073.

Kwon YH i Stipanuk MH (2001). Cysteine regulates expression of cysteine dioxygenase and gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol* 280:E804-E815.

L

Lambert IH (2004). Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem Res* 29:27-63.

Langer BW (1965). The biochemical conversion of 2-hydroxy-4-methylthiobutyric acid into methionine by the rat *in vitro*. *Biochem J* 95:683-687.

Lawson CQ i Ivey JF (1986). Hydrolysis of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid dimmer in two model systems. *Poult Sci* 65:1749-1753.

Le Bacquer O, Laboisie C i Darmaun D (2003). Glutamine preserves protein synthesis and paracellular permeability in Caco-2 cells submitted to "luminal fasting". *Am J Physiol* 285:G128-G136.

Le Ferrec E, Chesne C, Artusson P, Brayden D, Fabre G, Gires P, Guillou F, Rousset M, Rubas W i Scarino ML (2001). In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern Lab Anim* 29:649-668.

Lemme A, Hoehler D, Brennan JJ i Mannion PF (2002). Relative effectiveness of methionine hydroxyl analog compared to DL-methionine in broiler chickens. *Poult Sci* 81:838-845.

Lerner J, Yankelowitz S i Taylor MW (1969). The intestinal absorption of methionine in chickens provided with permanent *Thirty-Vella* fistulas. *Experientia* 25:689-691.

Livingston DM, Ferguson C, Gollogly R i Lazarus H (1976). Accumulation of cystine auxotrophic thymocytes accompanying type C viral leukemogenesis in the mouse. *Cell* 7:41-47.

Lu SC (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 13:1169-1183.

M

Maenz DD i Engele-Schaan CM (1996a). Methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid are transported by distinct Na⁺-dependent systems in the brush border membrane of the chick intestinal epithelium. *J Nutr* 126:529-536.

Maenz DD i Engele-Schaan CM (1996b). Methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid are partially converted to nonabsorbed compounds during passage through the small intestine and heat exposure does not affect small intestinal absorption of methionine sources in broiler chicks. *J Nutr* 126:1438-1444.

Martensson J, Jain A i Meister A (1990). Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1715-1719.

Martín-Venegas R, Roig-Pérez S, Ferrer R i Moreno JJ (2006a). Arachidonic acid cascade and epithelial barrier function during Caco-2 cell differentiation. *J Lipid Res*, en premsa.

- Martín-Venegas R, Soriano-García JF, Vinardell MP, Geraert PA i Ferrer R (2006b).** Oligomers are not the limiting factor in the absorption of DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid in the chicken small intestine. *Poult Sci* 85:56-63.
- Mascolo N, Rajendran VM i Binder HJ (1991).** Mechanism of short-chain fatty acid uptake by apical membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterology* 101:331-338.
- McCollum MQ, Vázquez-Añón M, Dibner JJ i Webb KE (2000).** Absorption of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid by isolated sheep ruminal and omasal epithelium. *J Anim Sci* 78:1078-1083.
- Mitjans M, Barniol G i Ferrer R (1997).** Mucosal surface area in chicken small intestine during development. *Cell Tissue Res* 290:71-78.
- Mongin P (1976).** Ionic constituents and osmolality of the intestinal fluids of the laying hen. *Br Poult Sci* 17:383-392.
- Moore S, Spackman DH i Stein WH (1954).** Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed Proc* 17:1107-1115.
- Motulsky HJ i Ransnas LA (1987).** Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *FASEB J* 1:365-374.
- Moyer MS, Goodrich AL, Rolfes MM i Suchy FJ (1988).** Ontogenesis of intestinal taurine transport: evidence for a beta-carrier in developing rat jejunum. *Am J Physiol* 254:G870-G877.
- Munck BG (1985a).** Transport of neutral and cationic amino acids across the brush-border membrane of the rabbit ileum. *J Membr Biol* 83:1-13.
- Munck BG (1985b).** Transport of imino acids and non-alpha-amino acids across the brush-border membrane of the rabbit ileum. *J Membr Biol* 83:15-24.
- Munck LK i Munck BG (1994a).** Amino acid transport in the small intestine. *Physiol Res* 43:335-346.

Munck LK i Munck BG (1994b). Chloride-dependent intestinal transport of imino and beta-amino acids in the guinea pig and rat. *Am J Physiol* 266:R997-R1007.

Munck LK i Munck BG (1999). Effects of pH changes on systems ASC and B in rabbit ileum. *Am J Physiol* 276:G173-G184.

Muñoz P, Guma A, Camps M, Furriols M, Testar X, Palacin M i Zorzano A (1992). Vanadate stimulates system A amino acid transport activity in skeletal muscle. Evidence for the involvement of intracellular pH as a mediator of vanadate action. *J Biol Chem* 267:10381-10388.

N

Nkabayo YS, Ziegler TR, Gu LH, Watson WH i Jones DP (2002). Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colon epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol* 283:G1352-G1359.

Nutrient Requirements of Poultry (1994). National Research Council. Ninth Revised Edition. National Academy Press (Washington, D.C).

O

O'Flaherty L, Stapleton PP, Redmond HP i Bouchier-Hayes DJ (1997). Intestinal taurine transport: a review. *Eur J Clin Invest* 27:873-880.

Obrador E, Navarro J, Mompo J, Asensi M, Pellicer JA i Estrela JM (1997). Glutathione and the rate of cellular proliferation determine tumour cell sensitivity to tumour necrosis factor in vivo. *Biochem J* 325:183-189.

Ogihara T, Tamai I, Takanaga H, Sai Y i Tsuji A (1996). Stereoselective and carrier-mediated transport of monocarboxylic acids across Caco-2 cells. *Pharm Res* 13:1828-1832.

Okamura A, Emoto A, Koyabu N, Ohtani H i Sawada Y (2002). Transport and uptake of nateglinide in Caco-2 cells and its inhibitory effect on human monocarboxylate transporter MCT1. *Br J Pharmacol* 137:391-399.

Ontiveros RR, Shermer WD i Berner RA (1987). An HPLC method for the determination of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid (HMB) in supplemented animal feeds. *J Agr Food Chem* 35:692-694.

Orlowski J (1993). Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na/H exchanger. *J Biol Chem* 268:16369-16377.

Orlowski J i Grinstein S (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflügers Arch* 447:549-565.

Osypiw DC, Gleeson D, Lobley RW, Pemberton PW i McMahon RFT (1994). Acid-base transport systems in a polarized human intestinal cell monolayer: Caco-2. *Exp Physiol* 79:723-739.

P

Palacin M i Kanai Y (2004). The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflügers Arch* 447:490-494.

Pan Y, Wong EA, Dibner JJ, Vázquez-Añón M i Webb KE (2002). Poly(A)⁺ RNA encoding proteins capable of transporting L-methionine and/or DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid are present in the intestinal mucosa of broilers. *J Nutr* 132:382-386.

Parks DR, Bryan VM, Oi VT i Herzenberg LA (1979). Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1962-1966.

Pasantes-Morales H, Quesada O i Moran J (1998). Taurine: an osmolyte in mammalian tissues. *Adv Exp Med Biol* 442:209-217.

Pegg AE (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 234:249-262.

Pegg AE, Xiong H, Feith DJ i Shantz LM (1998). S-adenosylmethionine decarboxylase: structure, function and regulation by polyamines. *Biochem Soc Trans* 26:580-586.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay M, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J i Zweibaum A (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47:323-330.

Poole RC i Halestrap AP (1993). Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 264:C761-C782.

R

Rangel-Lugo M i Austic RE (1998). Transamination of 2-oxo-4-(methylthio)butanoic acid in chicken tissues. *Poult Sci* 77:98-104.

Ray EC, Avissar NE, Vukcevic D, Toia L, Ryan CK, Berlanga-Acosta J i Sax HC (2003). Growth hormone and epidermal growth factor together enhance amino acid transport systems B⁰⁺ and A in remnant small intestine after massive enterectomy. *J Surg Res* 115:164-170.

Richards JD, Atwell CA, Vazquez-Añón M i Dibner JJ (2005). Comparative in vitro and in vivo absorption of 2-hydroxy-4(methylthio) butanoic acid and methionine in the broiler chicken. *Poult Sci* 84:1397-1405.

Richardson BC (2002). Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. *J Nutr* 132:2401-2405.

Ritzhaupt A, Wood IS, Ellis A, Hosie KB i Shirazi-Beechey SP (1998). Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *J Physiol* 513:719-732.

Roig-Pérez, Guardiola F, Moretó M i Ferrer R (2004). Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine. *J Lipid Res* 45:1418-1428.

Roig-Pérez, Moretó M i Ferrer R (2005). Transepithelial taurine transport in Caco-2 cell monolayers. *J Membr Biol* 204:85-92.

Rose PM, Hopper AF i Wannemacher RW (1971). Cell population changes in the intestinal mucosa of protein-depleted or starved rats. I. Changes in mitotic cycle time. *J Cell Biol* 50:887-892.

Rostagno HS i Barbosa WA (1995). Biological efficacy and absorption of DL-methionine hydroxy analogue free acid compared to DL-methionine in chickens as affected by heat stress. *Br Poult Sci* 36:303-312.

Rubino A, Field M i Shwachman H (1971). Intestinal transport of amino acid residues of dipeptides. I. Influx of the glycine residue of glycyl-L-proline across mucosal border. *J Biol Chem* 246:3542-3548.

S

Satsu H, Kobayashi Y, Yokoyama T, Terasawa E i Shimizu M (2002). Effect of dietary sulfur amino acids on the taurine content of rat tissues. *Amino Acids* 23:447-452.

Saunderson CL (1985). Comparative metabolism of L-methionine, DL-methionine and DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid in the broiler chicks. *Br J Nutr* 54:621-633.

Saunderson CL (1987). Effect of fasting and of methionine deficiency on L-methionine, DL-methionine and DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid metabolism in broiler chicks. *Br J Nutr* 57:429-437.

Saunderson CL i Mackinlay J (1990). Changes in body-weight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. *Br J Nutr* 63:339-349.

Saunderson CL (1991). Metabolism of methionine and its nutritional analogues. *Poult Int* 30:34-38.

Schmitz H, Fromm M, Bentze CJ, Scholz P, Dejten K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO i Schulzke JD (1999). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 112:117-146.

Schreiner CL i Jones EE (1987). Metabolism of methionine and methionine hydroxyanalogue by porcine kidney fibroblasts. *J Nutr* 117:1541-1549.

Schreiner CL i Jones EE (1988). Basis of the stereospecific preference of porcine kidney fibroblasts for D-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid as a source of methionine. *J Nutr* 118:818-828.

Shimizu M i Satsu H (2000). Physiological significance of taurine and the taurine transporter in intestinal epithelial cells. *Amino Acids* 19:605-614.

Shirazi-Beechey SP, Gribble SM, Wood IS, Tarpey PS, Beechey RB, Dyer J, Scott D i Barker PJ (1994). Dietary regulation of the intestinal sodium-dependent glucose cotransporter (SGLT1). *Biochem Soc Trans* 22:655-658.

Shotwell MA, Jayme DW, Kilberg MS i Oxender DL (1981). Neutral amino acid transport systems in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 256:5422-5427.

Shoveller AK, Stoll B, Ball RO i Burrin DG (2005). Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *J Nutr* 135:1609-1612.

Sloan JL i Mager S (1999). Cloning and functional expression of a human Na(+) and Cl(-)-dependent neutral and cationic amino acid transporter B(0+). *J Biol Chem* 274:23740-23745.

Song Z, Beers K, Dibner JJ, Vázquez-Añón M, McNew R i Bottje W (2001). The hepatic extraction of plasma free amino acids and response to hepatic portal venous infusion of methionine sources in anesthetized SCWL males (*Gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol B* 130:237-250.

Soriano-García JF, Torras-Llort M, Ferrer R i Moretó M (1998). Multiple pathways for L-methionine transport in brush-border membrane vesicles from chicken jejunum. *J Physiol* 509: 527-540.

Soriano-García JF, Torras-Llort M, Moretó M i Ferrer R (1999). Regulation of L-methionine and L-lysine uptake in chicken jejunal brush-border membrane by dietary methionine. *Am J Physiol* 277:R1654-R1661.

Steele RD, Barber TA, Lalich J i Benevenga NJ (1979). Effects of dietary 3-methylthiopropionate on metabolism, growth and hematopoiesis in the rat. *J Nutr* 109:1739-1751.

Steele RD i Benevenga NJ (1979). Identification of a transaminative pathway for ethionine catabolism. *Cancer Res* 39:3935-3941.

Stein J, Zores M i Schröder O (2000). Short-chain fatty acid (SCFA) uptake into Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier mediated transport mechanism. *Eur J Nutr* 39:121-125.

Stevens BR, Ross HJ i Wright EM (1982). Multiple transport pathways for neutral amino acids in rabbit jejunal brush border vesicles. *J Membr Biol* 66:213-225.

Stevens BR, Kaunitz JD i Wright EM (1984). Intestinal transport of amino acids and sugars: advances using membrane vesicles. *Annu Rev Physiol* 46:417-433.

Stipanuk MH i Benevenga NJ (1977). Effect of cystine on the metabolism of methionine in rats. *J Nutr* 107:1455-1467.

Stipanuk MH (1979). Effect of excess dietary methionine on the catabolism of cysteine in rats. *J Nutr* 109:2126-2139.

Stipanuk MH (1986). Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Nutr* 6:179-209.

Stipanuk MH, Londono M, Lee JI, Hu M i Yu AF (2002). Enzymes and metabolites of cysteine metabolism in nonhepatic tissues of rats show little response to changes in dietary protein or sulfur amino acid levels. *J Nutr* 132:3369-3378.

Stipanuk MH (2004). Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 24:539-577.

Stoll B, Henry J, Reeds PJ, Yu H, Jahoor F i Burrin DG (1998). Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J Nutr* 128:606-614.

Stoll B, Chang X, Fan MZ, Reeds PJ i Burrin DG (2000). Enteral nutrient intake level determines intestinal protein synthesis and accretion rates in neonatal pigs. *Am J Physiol* 279:G288-G294.

Sugawara M, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V i Ganapathy ME (2000). Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J Pharm Sci* 89:781-789.

Summers JD, Blackman S i Leeson S (1987). Assay for estimating the potency of various methionine-active sources. *Poult Sci* 66:1779-1787.

T

Tamai I, Takanaga H, Maeda H, Ogihara T, Yoneda M i Tsuji A (1995). Proton-cotransport of pravastatin across intestinal brush-border membrane. *Pharm Res* 12:1727-1732.

Tamai I, Sai Y, Ono A, Kido Y, Yabuuchi H, Takanaga H, Satoh E, Ogihara T, Amano O, Izeki S i Tsuji A (1998). Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1. *J Pharm Pharmacol* 51:1113-1121.

Tateishi N, Higashi T, Shinya S, Naruse A i Sakamoto Y (1974). Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J Biochem (Tokyo)* 75:93-103.

Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K i Shiozaki H (1977). Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr* 107:51-60.

Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A i Racker E (1979). Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 18:2210-2218.

Thwaites DT, Brown CDA, Hirst BH i Simmons NL (1993a). Transepithelial glycylsarcosine transport in intestinal Caco-2 cells mediated by expression of H⁺-coupled carriers at both apical and basal membranes. *J Biol Chem* 268:7640-7642.

- Thwaites DT, McEwan GTA, Brown CDA, Hirst BH i Simmons NL** (1993b). Na⁺-independent, H⁺-coupled transepithelial β -alanine absorption by human intestinal Caco-2 cells monolayers. *J Biol Chem* 268:18438-18441.
- Thwaites DT, McEwan GTA i Simmons NL** (1995). The role of the proton electrochemical gradient in the transepithelial absorption of amino acids by human intestinal Caco-2 cells monolayers. *J Membr Biol* 145:245-256.
- Thwaites DT, Markovich D, Murer H i Simmons NL** (1996). Na⁺-independent lysine transport in human intestinal Caco-2 cells. *J Membr Biol* 151:215-224.
- Thwaites DT, Ford D, Glanville M i Simmons NL** (1999). H⁺/solute-induced intracellular acidification leads to selective activation of apical Na⁺/H⁺ exchange in human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 104:629-635.
- Thwaites DT i Stevens BC** (1999). H⁺-zwitterionic amino acid symport at the brush-border membrane of human intestinal epithelial (CACO-2) cells. *Exp Physiol* 84:275-284.
- Thwaites DT, Kennedy DJ, Raldua D, Anderson CM, Mendoza ME, Bladen CL i Simmons NL** (2002). H/dipeptide absorption across the human intestinal epithelium is controlled indirectly via a functional Na/H exchanger. *Gastroenterology* 122:1322-1333.
- Tipton HC, Dilworth BC i Day EJ** (1966). A comparison of D-, L-, DL-methionine and methionine hydroxy analogue calcium in chick diets. *Poult Sci* 45:381-387.
- Tisdale MJ** (1980). Effect of methionine deprivation on methylation and synthesis of macromolecules. *Br J Cancer* 42:121-128.
- Torras-Llort M, Soriano-García JF, Ferrer R i Moretó M** (1998). Effect of a lysine-enriched diet on L-lysine transport by the brush-border membrane of the chicken jejunum. *Am J Physiol* 274:R69-R75.
- Tubbs PK i Greville GD** (1961). The oxidation of D- α -hydroxy acids in animal tissues. *Biochem J* 81:104-114.

U

Ueland PM i Refsum H (1989). Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 114:473-501.

Uren JR i Lazarus H (1979). L-cyst(e)ine requirements of malignant cells and progress toward depletion therapy. *Cancer Treat Rep* 63:1073-1079.

Usami M, Ohyanagi H, Ishimoto S, Nishimatsu S, Ueda T i Saitoh Y (1991). Effect of methionine-deprived nutrition on cell growth and cell kinetics in cell cultures and experimental tumours. *J Parent Enteral Nutr* 15:540-545.

V

Van Weerden EJ, Shutte JB i Bertram HL (1992). Utilization of the polymers of methionine hydroxyl analogue free acid (MHA-FA) in broiler chicks. *Arch Geflugelkd* 56:63-68.

Van Winkle LJ, Christensen HN i Campione AL (1985). Na⁺-dependent transport of basic, zwitterionic, and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts. *J Biol Chem* 260:12118-12123.

Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H i Kanai Y (2003). CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Arch* 447:532-542.

Voehringer DW (1999). BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic Biol Med* 27:945-950.

W

Wainfan E i Poirier LA (1992). Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 52:2071-2077.

Walker D, Thwaites DT, Simmons NL, Gilbert HJ i Hirst BH (1998). Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1. *J Physiol* 507:697-706.

Wang TG, Gotoh Y, Jennings MH, Rhoads CA i Aw TY (2000). Lipid hydroperoxide-induced apoptosis in human colonic CaCo-2 cells is associated with an early loss of cellular redox balance. *FASEB J* 14:1567-1576.

Wapnir RA, Hawkins RL i Lifshitz F (1972). Hiperaminoacidemia effects on intestinal transport of related amino acids. *Am J Physiol* 223:788-793.

Wilson TH i Wisman G (1954). The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol* 123:116-125.

Windmueller HG i Spaeth AE (1980). Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. *J Biol Chem* 255:107-112.

Winne D (1979). Rat jejunum perfused in situ: effect of perfusion rate and intraluminal radius on absorption rate and effective unstirred layer thickness. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 307:265-274.

Wright CE, Tallan HH, Lin YY i Gaull GE (1986). Taurine: biological update. *Annu Rev Biochem* 55:427-453.

Wu G, Knabe DA, Flynn NE, Yan W i Flynn SP (1996). Arginine degradation in developing porcine enterocytes. *Am J Physiol* 271:G913-G919.

Wu G (1998). Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr* 128:1249-1952.

Y

Young VR (2004). Introduction to the 3rd Amino Acid Assessment Workshop. *J Nutr* 134:1555S-1557S.



Z

Zheng L, Chen J, Zhu Y, Yang H, Elmquist W i Hu M (1994). Comparison of the transport characteristics of D- and L-methionine in a human intestinal epithelial model (Caco-2) and in a perfused rat intestinal model. *Pharm Res* 11:1771-1776.

Zimmerman RA i Scott HM (1965). Interrelationship of plasma amino acid levels and weight gain in the chick as influenced by suboptimal and superoptimal dietary concentrations of single amino acids. *J Nutr* 87:13-18.

Oligomers Are Not the Limiting Factor in the Absorption of DL-2-Hydroxy-4-(methylthio)butanoic Acid in the Chicken Small Intestine¹

R. Martín-Venegas,* J. F. Soriano-García,* M. P. Vinardell,* P. A. Geraert,† and R. Ferrer*²

*Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028-Barcelona;
and †Adisseo France S.A.S., 92160-Antony, France

ABSTRACT The methionine hydroxy analogue DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid (HMB) is commonly used as a supplemental source of methionine in commercial animal diets. The HMB free acid is an aqueous solution that contains 88% product in an equilibrium mixture of monomer, dimer, and polymeric compounds. The present study examines whether the presence of these nonmonomeric forms reduces the absorption of the hydroxy analogue in the chicken small intestine. In vivo and in vitro methodologies were used to compare the intestinal absorption of an HMB product containing mainly monomer (HMB-PCM) with commercial HMB. The results from the in vivo perfusion of the jejunum showed no significant differences between the 2 hydroxy analogue sources in monomer absorption from the intestinal

lumen, tissue accumulation, or plasma concentration. The results also indicate that the nonmonomeric forms are hydrolyzed during perfusion. Moreover, monomer tissue accumulation in everted sacs showed no significant differences between substrates, either in the presence or in the absence of a H⁺-gradient; a higher value was observed in the jejunum and ileum in comparison with the duodenum. Similarly, serosal appearance in H⁺-gradient conditions did not differ significantly between substrates, and it showed the same regional profile as in tissue accumulation. Oligomer hydrolysis was confirmed in vitro without significant differences between segments. In conclusion, the presence of nonmonomeric forms is not a limiting factor in HMB absorption, apparently because of the hydrolytic capacity of intestinal mucosa, as confirmed by experiments in vivo and in vitro.

Key words: DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid, methionine hydroxy analogue, in vivo and in vitro intestinal absorption, chicken

2006 Poultry Science 85:56–63

INTRODUCTION

Supplementary sources of methionine are commonly added to commercial animal diets to ensure that the nutritional requirement for this essential amino acid is satisfied. Synthetic sources are usually provided either as DL-methionine (99% pure) or as liquid methionine hydroxy analogue DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic (HMB) free acid, which contains 88% active substance. Similar to all liquid α -hydroxy acids, HMB forms intermolecular esters that result in a dynamic equilibrium mixture of monomers (65%, wt/wt), dimers (18%, wt/wt), trimers (3%, wt/wt), and higher oligomers (2%, wt/wt) (Koban and Koberstein, 1984; Lawson and Ivey, 1986). Boebel and Baker (1982) reported that HMB free acid polymers had

an efficacy of only 54% that of DL-methionine when compared on a molar basis; they concluded that oligomer hydrolysis is required for efficient use. These oligomeric forms are rather stable toward hydrolysis under nonenzymatic physiological conditions of pH and temperature (Koban and Koberstein, 1984). In contrast, in a model that simulates the enzymatic environment of the duodenum, Lawson and Ivey (1986) reported that hydrolysis may be derived from water-soluble pancreatic enzymes found in pancreatin and highlighted the importance of oligomer hydrolysis for further HMB biological studies.

The bioefficacy of HMB compared with DL-methionine has been the subject of many studies (Huyghebaert and Van Schagen, 1989; Thomas et al., 1991; Esteve-García and Austic, 1993; Huyghebaert, 1993; Rostagno and Barbosa, 1995; Maenz and Engele-Schaan, 1996b; Esteve-García and Llauroadó, 1997; Lemme et al., 2002); however, there is still debate about the possible differences between these sources. Some authors (Huyghebaert and Van Schagen, 1989; Huyghebaert, 1993; Drew et al., 2003) have indicated that the biological efficacy of HMB has often been difficult to assess because of the distinct type of basal diet, age and strain of the chickens used, intestinal bacteria, amount of DL-methionine or HMB supplemented, and degree of

©2006 Poultry Science Association, Inc.
Received March 14, 2005.

Accepted September 24, 2005.

¹The present study was supported by project 3891 from the Fundació Bosch i Gimpera and Adisseo France S.A.S. and by grant 2005-SGR-0632 from the Generalitat de Catalunya. R. Martín-Venegas holds a Recerca i Docència fellowship from the Universitat de Barcelona.

²Corresponding author: rutferrer@ub.edu

HMB polymerization. Because HMB oligomers are poorly absorbed in the chicken intestine (Saunderson, 1991) and are less effective than the commercial product (Van Weerden et al., 1992), we hypothesized that the absence of nonmonomeric forms would enhance the absorption rate of the hydroxy analogue. To test our hypothesis, we compared the absorption of an HMB product containing mainly monomer (HMB-PCM) with commercial HMB. In addition, HMB oligomer hydrolysis by the intestinal mucosa was estimated. Because HMB transport in the intestinal brush-border membrane is mediated by a H⁺-dependent transport system (Brachet and Puigserver, 1987, 1989; Maenz and Engele-Schaan, 1996a; Pan et al., 2002), we also examined the effect of pH on HMB-PCM transport as well as the regional profile along the chicken small intestine and compared results with those for commercial HMB.

MATERIALS AND METHODS

Chickens and Diets

Male Ross chickens (*Gallus gallus domesticus* L.; Granja Crusvi, Montblanc, Catalonia) were raised at standardized temperature, humidity, and light (L:D, 16:8) at a density of about one chicken/500 cm². The birds were fed ad libitum from hatch until d 18 to 21 with balanced diets (IRTA-Mas Bové, Generalitat de Catalunya, Reus, Catalonia) (Table 1). These diets were supplemented with HMB-PCM (Adisseo France S.A.S, Antony, France) or HMB (Adisseo France S.A.S.) as a source of methionine and contained equal total monomer amounts (ammonium salt or free acid, respectively) if the oligomers were hydrolyzed, according to the composition in monomeric, dimeric, and trimeric forms reported by the manufacturer (Table 2). Monomer intestinal absorption from HMB-PCM in comparison with HMB was studied in 18- to 21-d-old animals fed HMB-PCM or commercial HMB, respectively. Body weights were recorded before the experiment, and no significant differences were detected between both groups [HMB-PCM: 553.3 ± 34.6 g, n = 26; HMB: 564.1 ± 56.3 g, n = 15 (mean ± SEM); *P* ≥ 0.05]. The experimental protocols were approved by the Experimental Animal Ethical Research Committee of the Universitat de Barcelona in accordance with current regulations for the use and handling of experimental animals (Decret 214/97, Generalitat de Catalunya).

In Vivo Experiments

The jejunum was perfused in vivo following the procedures of Vinardell et al. (1986). After a 24-h feed withdrawal, anesthesia was induced by i.m. administration of Zoletil (60 mg/kg; Tiletamine-zolazepam, Virbac, France) and monitored; body temperature was also monitored throughout the experimental period. Following induction of general anesthesia, a medial laparotomy was performed. A loop of the jejunum of 10 to 15 cm in length, immediately distal to Meckel's diverticulum, was cannu-

Table 1. Composition of the experimental diets

Ingredient	(g/kg of feed)
Wheat	156.35
Maize	301.56
Lard	30.00
Peas	180.00
Soybean meal, 47.5% protein	180.84
Full-fat extruded soybeans	111.08
L-lysine HCl	0.35
Calcium carbonate	11.79
Dicalcium phosphate	19.34
Salt	4.55
Minerals and vitamins ¹	4.00
Choline chloride	0.15
Nicarbazine	0.125
Nutrient composition	
Crude protein	208.00
Crude fiber	35.00
Ether extract	70.00
Lysine	12.10
Methionine	2.90
Cysteine	3.30
HMB-PCM or HMB ²	3.26/2.66
Threonine	7.70
Tryptophan	2.20
Calcium	10.00
Total phosphorus	7.10
Inorganic phosphorus	4.50
Sodium	1.20
Chloride	2.90
ME (kcal/kg of feed; 12.75 MJ/kg)	3,050

¹One kilogram of feed contains: vitamin A, 12,000 IU (retinyl acetate); cholecalciferol, 2,400 IU; vitamin E, 30 IU (DL- α -tocopheryl acetate); vitamin B₁, 2.2 mg; vitamin B₂, 8 mg; vitamin B₆, 5 mg; vitamin B₁₂, 11 μ g; folic acid, 1.5 mg; biotin, 150 μ g; Ca pantothenate, 25 mg; nicotinic acid, 65 mg; Mn, 60 mg; Zn, 40 mg; I, 0.33 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Se, 0.15 mg; and ethoxyquin, 150 mg.

²HMB [DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid] or HMB-PCM (HMB product containing mainly monomer) served as the source of methionine.

lated and connected to a perfusion system equipped with a peristaltic pump (Minipuls 2, Gilson, France) to allow luminal perfusion at a flow rate of 2 mL/min.

All vessels from the mesenteric root were ligated except those supplying the intestinal segment to be perfused. The intestine was covered with cotton gauze moistened with saline solution (9 g of NaCl/L) to prevent drying. The luminal perfusate consisted of a modified Krebs-Henseleit buffer containing the following: 118 mmol of

Table 2. Composition of the HMB-PCM and HMB products¹

	HMB-PCM	HMB
	(g/kg)	
HMTBA ²	<1	680
HMTBS ³	795	—
DHMTBA ⁴	3	170
THMTBA ⁵	1	30
Water	200	120

¹HMB = DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid; HMB-PCM = HMB product containing mainly monomer.

²DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid, monomeric form.

³Ammonium salt of the HMTBA.

⁴Dimeric form of the HMTBA.

⁵Trimeric form of the HMTBA.

NaCl/L, 4.74 mmol of KCl/L, 1.18 mmol of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /L, 1.27 mmol of CaCl_2 /L, 1.18 mmol of KH_2PO_4 /L, 25 mmol of Tris/2-(4-morpholino)ethanesulfonic acid/L, and 4 mmol of HMB-PCM or HMB/L (equal total monomer concentrations if the oligomers were hydrolyzed). The pH of the perfusate was adjusted to 6.0, simulating the physiological pH of the jejunum (Sturkei, 1986). Samples were taken from the output perfusate at 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min. At the end of the experiment, a blood sample was obtained by heart puncture, and the animal was killed by an anesthetic overdose. Plasma was obtained by centrifugation ($1,900 \times g$, 10 min) in the presence of heparin (1,000 U/mL). The perfused segment was immediately removed, flushed with ice-cold saline, cut longitudinally, and carefully blotted with a piece of filter-paper moistened with saline solution. It was then laid, in a straight line without loops and without stretching, on a piece of tracing paper, and the perimeter was drawn. To measure the perfused intestinal surface area, the image obtained was scanned and processed by an image analysis system (IMAT, Científicotècnics, Universitat de Barcelona). To quantify substrate accumulated in the intestinal wall, a portion of ~1 g of the perfused segment, immediately distal to Meckel's diverticulum, was excised, weighed, extracted overnight in 1 mL of HNO_3 0.1 eq/L with continuous shaking, and centrifuged ($1,900 \times g$, 5 min). The substrate was then quantified in the supernatant. All of the samples obtained were stored at -80°C until measurement. Results were expressed as cumulative changes in luminal monomer concentration normalized to surface intestinal area (nmol/cm^2), substrate accumulation into the intestinal wall normalized to wet weight ($\text{nmol}/100 \text{ mg}$), or as substrate concentration (mmol/L) in the plasma.

In Vitro Experiments

The chickens were anaesthetized with 60 mg of Zoletil/kg and killed by decapitation without previous starvation. A portion of the duodenum (pancreatic loop), jejunum (6 cm proximal and distal to Meckel's diverticulum), and ileum (the region connected with mesentery to the caeca) was removed and immediately flushed with ice-cold saline solution (4°C). Everted sacs were prepared following the procedure of Wilson and Wiseman (1954). The intestinal segments were turned inside-out (mucosa out-serosa in) and cut into 4 portions of about 3 cm in length. Each portion was tied at the ends to form a sac and was filled with the serosal medium and incubated for 30 min at 37°C in 15 mL of the mucosal medium, which was continuously gassed with carbogen (95% O_2 and 5% CO_2). At the end of the incubation, the sacs were dried, weighed, and their content was carefully drained. The decrease in weight was taken as the volume of fluid remaining after incubation. The serosal content was then centrifuged ($16,000 \times g$, 5 min), and the supernatant was stored at -80°C until measurement. The empty sac was dried, weighed, and extracted overnight in 1 mL of HNO_3

0.1 eq/L with continuous shaking, centrifuged ($1,900 \times g$, 5 min), and stored at -80°C .

The mucosal medium was the same Krebs-Henseleit bicarbonate buffer, which contained the following: 118 mmol of NaCl/L, 4.74 mmol of KCl/L, 1.18 mmol of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /L, 1.27 mmol of CaCl_2 /L, 1.18 mmol of KH_2PO_4 /L, 25 mmol of NaHCO_3 /L, and 7 mmol of HMB-PCM or HMB/L (see *in vivo* experiments). The medium was gassed with carbogen until pH 7.4. For the experiments performed at pH 5.5, bicarbonate was replaced by 2-(4-morpholino)ethanesulfonic acid, and pH was adjusted with Tris. In all experiments, the serosal medium was the bicarbonate buffer (pH 7.4) without substrate. The pH of all of these solutions was maintained during incubation. Because substrate appearance at the serosal side was predicted to be low, a higher substrate concentration than that used for the *in vivo* experiments (7 vs. 4 mmol/L) was tested to improve HPLC quantification. Results on substrate appearance at the serosal compartment and accumulation in tissue were normalized to the weight of the empty sac after incubation and expressed as nmol per 100 mg of tissue. Substrate was also quantified in the mucosal compartment, and the results were expressed as mmol per L.

HPLC Analysis

The HMB-PCM and HMB monomer concentrations were measured following the protocol of Adisseo France, S.A.S. in the Serveis Científicotècnics of the Universitat de Barcelona, using reversed-phase C_{18} HPLC analysis. The samples were filtered [MILLEX-HV (0.45 μm), Millipore, Madrid] and injected into an HPLC system [Waters 2690, Waters Chromatography, Milford, MA; equipped with a 250×4.6 -mm Inerstil ODS2 column of 5- μm particle size and protected by an octadecyl silane guard column (G.L. Sciences, Japan)]. Mobile phase was a mixture (8:92; vol/vol) of HPLC-grade acetonitrile and milliQ water acidified with concentrated H_3PO_4 to pH 2. The sample was injected into the column using a 20- μL loop sample injector and eluted in isocratic conditions at a flow rate of 0.8 mL/min at 45°C for 20 min (Column oven 480, Bio-Tek Instruments, Milan, Italy). Detection was by UV absorbance at 214 nm (HPLC detector 432, Bio-Tek Instruments), and substrate concentration was measured by integrating peak areas using a computerized data manager (Millennium 32, Milford, MA). Substrate concentration was calculated from the calibration curve prepared using HMB Ca^{2+} salt as the standard. For substrate quantification in plasma, the samples were deproteinized with one-half volume of 10% trifluoroacetic acid (vol/vol). Under the specified column conditions, the monomer of the 2 substrates and HMB Ca^{2+} salt was eluted in one peak at a same t_R (retention time) of about 12 min in a region of the chromatogram that was free from interference.

Oligomer Hydrolysis

The difference in oligomer concentration between initial and incubated perfusates or mucosal media was as-

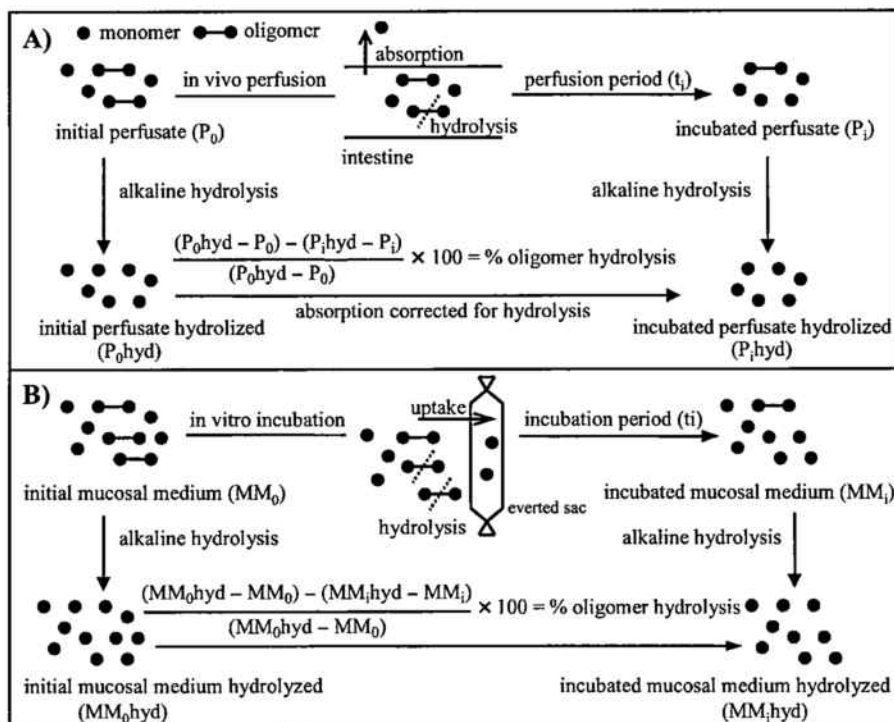


Figure 1. Experimental design for oligomer hydrolysis estimation. Oligomer concentration was calculated from the difference in monomer concentration before and after sample alkaline hydrolysis. Hydrolysis of HMB (DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid) was then expressed as a percentage of oligomer hydrolyzed (the difference in oligomer concentration before and after perfusion or incubation) with respect to initial oligomer concentration in perfusates (A) or mucosal media (B).

sumed to be a measure of intestinal HMB oligomer hydrolysis (Figure 1). Oligomer concentration was calculated from the difference in monomer concentration before and after sample alkaline hydrolysis following the procedure of Ontiveros et al. (1997) with some modifications. Sixty microliters of 50% KOH was added to a 500- μ L aliquot, which was stirred for 1 min; then, 60 μ L of 80% HCl (vol/vol) were added, and the mixture was stirred again for 30 s. The sample was then centrifuged ($10,000 \times g$, 10 min) and passed through a 0.22- μ m filter before injection into the HPLC system. The data were expressed as a percentage of oligomer hydrolyzed (the difference in oligomer concentration before and after perfusion or incubation) with respect to initial oligomer concentration in the perfusate or mucosal medium (Figure 1).

Statistical Analysis

The results are reported as means $\pm$ SEM. All data were compared by one-way ANOVA and Student's *t*-test using SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL). $P < 0.05$ was considered to denote significance.

RESULTS

In Vivo Experiments

The profiles of the changes observed in cumulative monomer luminal concentration after in vivo perfusion

are shown in Figure 2. The results show monomer disappearance for HMB-PCM, thus indicating that it is absorbed from the intestinal lumen. Meanwhile, the increase in monomer concentration detected for HMB may suggest that it is secreted to the perfusate. To examine this unexpected result, monomer concentration was measured in plasma at the end of perfusion. The monomer concentration of plasma did not differ significantly between substrates [HMP-PCM: 0.17 ± 0.02 mmol/L, $n = 4$; HMB: 0.18 ± 0.03 mmol/L, $n = 5$ (mean $\pm$ SEM); $P \geq 0.05$], suggesting that HMB was absorbed. Moreover, no significant differences between substrates were detected regarding accumulation in the intestinal wall [HMP-PCM: 87.1 ± 15.4 nmol/100 mg of tissue, $n = 4$; HMB: 80.4 ± 11.6 nmol/100 mg of tissue, $n = 6$ (mean $\pm$ SEM); $P \geq 0.05$]. As the increase in HMB monomer concentration in the intestinal perfusate might have been caused by oligomer intestinal hydrolysis during perfusion, we measured monomer concentration after alkaline hydrolysis of the perfusate samples (Figure 1A). Our results indicate a reduction in percentage of oligomer concentration during intestinal passage (Table 3) and, thus, an increase in luminal monomer concentration. The results from the in vivo HMB perfusion were then corrected for intestinal oligomer hydrolysis (Figure 2), taking into account that nonmonomeric forms are presumably not absorbed (Saunderson, 1991). The results show no significant differences between the

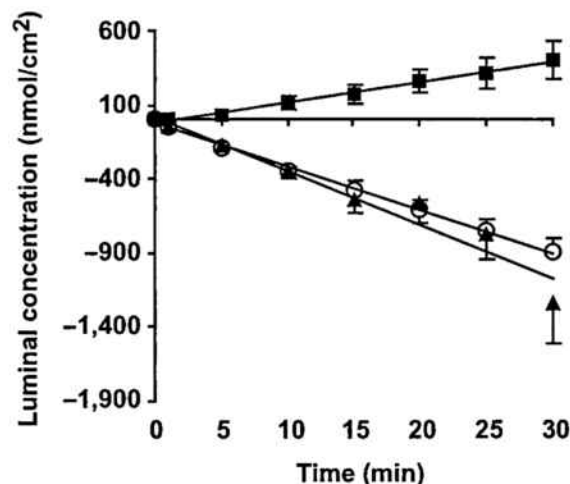


Figure 2. Cumulative changes in luminal monomer concentration normalized to surface area. The jejunum was perfused over the 30 min at a flow rate of 2 mL/min with a modified Krebs-Henseleit buffer containing 4 mmol of HMB-PCM (HMB-product containing mainly monomer) or HMB (DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid)/L, following the methodology described by Vinardell et al. (1986). Monomer HMB cumulative changes corrected for intestinal oligomer hydrolysis (HMB-hyd; $\blacktriangle$) correspond to monomer HMB cumulative changes ($\blacksquare$) corrected for oligomer hydrolysis during intestinal passage (Figure 1A). The results are expressed as means $\pm$ SEM of 15 chickens. The statistical analysis shows no significant differences between HMB-PCM ($\circ$) and HMB-hyd ($P \geq 0.05$).

absorption of the 2 substrates (HMB-PCM vs. monomer HMB cumulative changes corrected for intestinal oligomer hydrolysis).

In Vitro Experiments

Monomer accumulation in the intestinal wall was examined at a mucosal pH of 5.5 and 7.4, maintaining a 7.4 pH in the serosal compartment. At a pH of 5.5, the results show (Figure 3), for both substrates, a significantly higher accumulation in the jejunum and ileum when compared with the results obtained at a mucosal pH of 7.4, without significant pH effect in the duodenum. The regional pro-

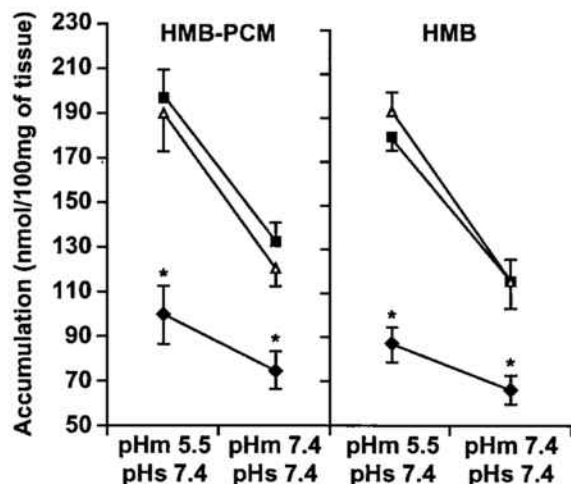


Figure 3. Monomer accumulation in the intestinal wall of everted sacs incubated for 30 min with 7 mmol of HMB-PCM (HMB-product containing mainly monomer) or HMB (DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid)/L in the mucosal compartment from duodenum ($\bullet$), jejunum ($\blacksquare$), and ileum ($\blacktriangle$) in the presence (pHm 5.5 to pHs 7.4) or absence (pHm 7.4 to pHs 7.4) of a H^+ -gradient. pHm and pHs correspond to the pH of the mucosal and serosal compartment, respectively. The results are expressed as means $\pm$ SEM of 5 to 7 sacs. *Mean differences between intestinal segments ($P < 0.05$). Significant differences between pH conditions were only detected for the jejunum and ileum ($P < 0.05$).

file for both substrates and pH conditions reveals the lowest values in the duodenum and no differences between the jejunum and ileum. Moreover, no significant differences ($P \geq 0.05$) were detected in accumulation in tissue between substrates, either in the presence or in the absence of a H^+ -gradient.

The results of monomer serosal appearance evaluated at a mucosal pH of 5.5 (Figure 4) confirm the lack of differences between the 2 substrates and the regional profile previously described for accumulation in tissue.

Figure 5 shows the changes in monomer concentration in the mucosal compartment before and after 30 min of incubation. The differences detected between substrates correspond to the different amount of monomer present in these products. After the incubation period, the significant reduction observed for HMB-PCM monomer concentration in all intestinal segments is indicative of absorption. In contrast, monomer concentration increased in HMB-incubated sacs, thus confirming, under in vitro conditions, the capacity of the intestine to hydrolyze the oligomers. Calculation of mucosal hydrolysis following the strategy shown in Figure 1B reveals no significant differences in the 3 intestinal segments (Table 3).

DISCUSSION

Methionine is a limiting essential amino acid in commercial diets for broiler chickens. To support this nutritional requirement, DL-methionine or its hydroxy analogue (HMB) is included in the feeds. Many studies have addressed the relative biological efficacy of these methio-

Table 3. DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid (HMB) oligomer intestinal hydrolysis¹

	in vivo	in vitro
	(%)	
Duodenum	—	60.36 $\pm$ 2.51 (5)
Jejunum	40.35 $\pm$ 6.01 (13)	51.71 $\pm$ 4.04 (10)
Ileum	—	50.25 $\pm$ 4.12 (10)

¹HMB oligomer hydrolysis after 30 min of in vivo perfusion of the jejunum with 4 mmol of HMB/L and after 30 min of in vitro incubation with 7 mmol of HMB/L. Results are expressed as means $\pm$ SEM (n in brackets) of the percentage of oligomer hydrolyzed (the difference in oligomer concentration before and after perfusion or incubation) with respect to initial oligomer concentration in perfusates or mucosal media (Figure 1). The statistical analysis shows no significant differences within the in vitro column ($P \geq 0.05$).

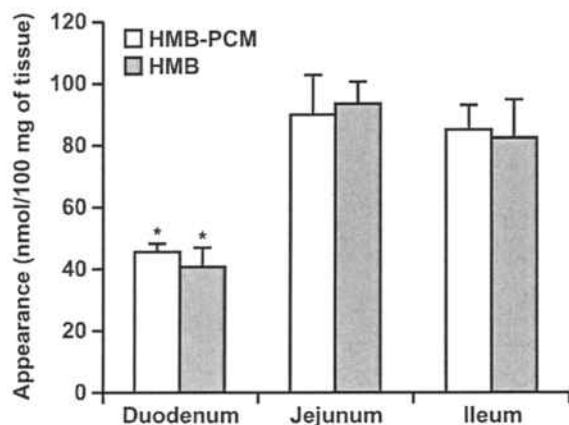


Figure 4. Monomer serosal appearance in everted sacs incubated for 30 min with 7 mmol of HMB-PCM (HMB-product containing mainly monomer) or HMB (DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid)/L in the mucosal compartment in the presence of a H^+ -gradient. The results are expressed as means $\pm$ SEM of 14 to 16 sacs for the duodenum, 20 to 21 for the jejunum, and 18 to 21 for the ileum. The statistical analyses show no significant differences between substrates. *Mean differences between intestinal segments ($P < 0.05$).

nine sources; however, there is still some controversy. Commercial HMB contains a significant proportion of nonmonomeric forms (Koban and Koberstein, 1984; Lawson and Ivey, 1986), which are poorly absorbed by chicken intestine (Saunderson, 1991) and have a lower biopotency than the monomeric form (Van Weerden et al., 1992). Therefore, to attain nutritional value, it is assumed that these nonmonomeric forms are hydrolyzed (Boebel and Baker, 1982). The present study was designed to determine whether the presence of these nonmonomeric forms was a limiting factor in HMB bioefficacy by comparing

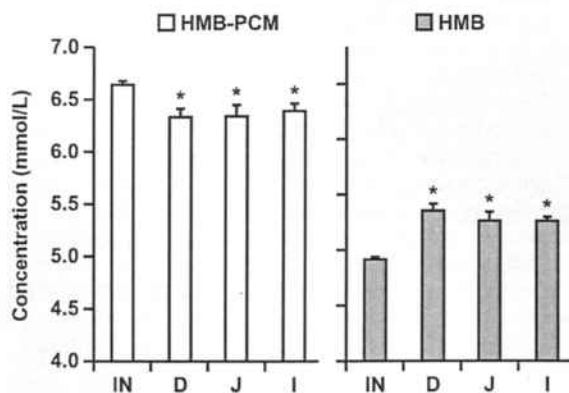


Figure 5. Monomer concentration in the mucosal compartment of everted sacs before (initial concentration, IN) and after a 30-min incubation (duodenum, D; jejunum, J; and ileum, I) with 7 mmol of HMB-PCM (HMB-product containing mainly monomer) or HMB (DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid)/L in the mucosal compartment in the presence of a H^+ -gradient. The results are expressed as means $\pm$ SEM of $n = 3$ to 6 mucosal media. *Mean differs from respective initial concentration ($P < 0.05$).

2 hydroxy analogues: an HMB-PCM and the standard HMB containing dimers and other oligomers, compositions of which are presented in Table 2.

The data of in vivo HMB-PCM and HMB absorption corrected for oligomer hydrolysis did not differ significantly between substrates. Moreover, HMB-PCM and HMB monomer accumulation in the intestinal wall and plasma concentration showed no significant differences, thus confirming that the 2 substrates were absorbed in vivo at the same rate. Regarding in vitro results, monomer concentration from HMB-PCM decreased during incubation in the mucosal media, thus confirming substrate uptake. However, an increase was detected for mucosal HMB, thus indicating, as in experiments in vivo, the ability of the intestine to hydrolyze nonmonomeric forms at a rate that is greater than absorption.

Oligomer hydrolysis after a 30-min incubation was calculated to be about 40% in vivo and ranged from 50 to 60% in vitro. The difference found between the 2 experimental conditions might arise from the higher substrate concentration used in everted sacs (7 vs. 4 mmol/L). Lawson and Ivey (1986) reported 50% enzymatic hydrolysis when commercial HMB was incubated for 30 min in simulated pancreatic fluid and concluded that hydrolytic activity was derived from one, or perhaps several, of the water-soluble pancreatic enzymes found in pancreatin. They found that dimer hydrolysis was approximately 70% complete after 1 h incubation in chicken excised duodenal sacs and extended to 92% after 2 h. To date, 5 digestive enzymes present in simulated intestinal fluid have also been proposed to participate in this process (Bruyer et al., 1988; Bruyer and Vanbelle, 1990). The results reported here confirm the hydrolytic capacity of the duodenal mucosa previously described (Lawson and Ivey, 1986) and also attribute remarkable activity to the other segments of the small intestine. Taking into account that both pancreatic and mucosal enzymes participate in oligomer hydrolysis, the capacity of the chicken small intestine may overcome that detected in the experimental conditions just discussed. Furthermore, the duodenum might play a relevant role in this process, as pancreatic juice empties in this segment where, in addition, the mucosal hydrolytic activity is considerable.

There is little information on the regional absorption profile of HMB along the chicken small intestine. Knight and Dibner (1984) found no differences in HMB tissue accumulation, although a few years later, using a different experimental procedure, Dibner et al. (1988) concluded that the major site of HMB absorption is the proximal loop of the duodenum and mid jejunum. In contrast, Pan et al. (2002) reported the presence of poly(A)⁺ RNA that encodes proteins capable of mediated H^+ -dependent HMB transport in broiler intestinal mucosa. Those authors found, in oocytes injected with duodenal, jejunal, and ileal chicken poly(A)⁺ RNA, higher HMB transport values for the more distal segments. Accordingly, our results show that, in the presence or absence of a H^+ gradient, the duodenum has the lowest serosal and tissue substrate concentrations. These results support the find-

ings of previous studies that implicate more distal regions of the intestine in the absorption of nutrients (Erickson et al., 1995; Ogihara et al., 1996; Adibi, 1997).

We have previously described that L-methionine transport in the chicken intestine is mediated by 4 transport systems regulated by dietary DL-methionine (Soriano-Garcia et al., 1998, 1999), which show many differences from the characteristics attributed to HMB transport. Membrane uptake of monocarboxylic acids was described to occur by passive diffusion of the protonated form according to the pH partition hypothesis. In this sense, some authors have reported that HMB absorption in the chicken small intestine occurs mainly by passive diffusion (Lerner et al., 1969; Knight and Dibner, 1984; Dibner et al., 1992). However, taking into account that the concentration ratio of ionized to unionized species depends on pKa and pH (Henderson-Hasselbach equation), at the mucosal pH conditions tested in the present study, HMB-PCM and HMB, with a pKa of 1.5 and 3.6, respectively, were predominantly ionized (>98% for both substrates and pH conditions). Therefore, the amount of the protonated form of the 2 substrates accounts for only a small fraction, thus indicating that not only passive permeation through the epithelium, but also carrier-mediated transport, is needed to explain their absorption. In rat and chicken intestinal brush-border membrane, Brachet and Puigserver (1987, 1989) demonstrated the participation of a nonstereospecific and Na⁺-independent transport mechanism in addition to passive diffusion (Brachet and Puigserver, 1989). Maenz and Engele-Schaan (1996a) found this mechanism to be H⁺-dependent and considered simple diffusion negligible. Pan et al. (2002) also reported a mediated H⁺-dependent HMB transport mechanism in oocytes injected with poly(A)⁺ RNA from broiler intestinal mucosa. Our results indicate that accumulation of the 2 substrates in tissue was significantly affected by mucosal pH; higher uptake occurred in the jejunum and ileum under a pH gradient, thus confirming the dependence on H⁺-gradient. Regarding the transport mechanism, Thwaites and Stevens (1999) described a model for Na⁺-independent and pH-dependent dipolar amino acid transport in which the zwitterionic form and the H⁺ bind to the carrier to be co-transported across the membrane. Accordingly, HMB-PCM and HMB, with pKa in the range of these amino acids, would be transported in its anionic form independently of its chemical structure (ammonium salt or free acid).

In summary, our in vivo and in vitro results show that the amount of HMB nonmonomeric forms is reduced during intestinal passage and that monomer uptake is not affected by the hydroxy analogue source used in any of the experimental conditions tested. Moreover, H⁺-dependence of monomer transport was confirmed along the chicken small intestine, mainly in the more distal regions, which, in addition, exhibit the highest uptake rates. This study is the first to compare intestinal absorption of an HMB-PCM with commercial HMB and to examine the contribution of intestinal hydrolytic activity. We conclude that the presence of nonmonomeric forms is not a limiting

factor in HMB absorption, apparently because of the hydrolytic capacity of intestinal mucosa.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Enric Esteve from IRTA-Mas Bové (Generalitat de Catalunya, Reus, Catalonia) for diet preparation and discussions on efficacy of dietary methionine sources. The valuable help of the staff of Serveis Científicotècnics of the Universitat de Barcelona is also gratefully acknowledged; especially, we would like to express our sincere thanks to Maria Reixac and Teresa Barajas.

REFERENCES

- Adibi, S. A. 1997. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: Biology and function. *Gastroenterology* 113:332-340.
- Boebel, K. P., and D. H. Baker. 1982. Efficacy of calcium salt and free acid forms of methionine hydroxy analog for chicks. *Poult. Sci.* 61:1167-1175.
- Brachet, P., and A. Puigserver. 1987. Transport of methionine hydroxy analog across the brush border membrane of rat jejunum. *J. Nutr.* 117:1241-1246.
- Brachet, P., and A. Puigserver. 1989. Na⁺-independent and non-stereospecific transport of 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid by brush border membrane vesicles from chick small intestine. *Comp. Biochem. Physiol. B* 94:157-163.
- Bruyer, D. C., and M. Vanbelle. 1990. Efficacité comparée pour la croissance du poussin de différentes sources de méthionine. *Ann. Zootech.* 39:45-51.
- Bruyer, D. C., M. Vanbelle, and A. Baudichau. 1988. Hydrolysis of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid dimer in simulated intestinal fluid. Pages 163-172 in *Proceedings of the International Symposium of Budapest. Biotechnology and Food Industry*, Budapest, Hungary.
- Dibner, J. J., C. A. Atwell, and F. J. Ivey. 1992. Effect of heat stress on 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid and DL-methionine absorption measured in vitro. *Poult. Sci.* 71:1900-1910.
- Dibner, J. J., C. D. Knight, R. A. Swick, and F. J. Ivey. 1988. Absorption of ¹⁴C-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid (Alimet®) from the hindgut of the broiler chick. *Poult. Sci.* 67:1314-1321.
- Drew, M. D., A. G. Van Kessel, and D. D. Maenz. 2003. Absorption of methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid in conventional and germ-free chickens. *Poult. Sci.* 82:1149-1153.
- Erickson, R. H., J. R. Gum, M. M. Lindstrom, D. McKean, and Y. S. Kim. 1995. Regional expression and dietary regulation of rat small intestinal peptide and amino acid transporter mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216:249-257.
- Esteve-Garcia, E., and R. E. Austic. 1993. Intestinal absorption and renal excretion of dietary methionine sources by the growing chicken. *J. Nutr. Biochem.* 4:576-587.
- Esteve-Garcia, E., and L. L. Llauredó. 1997. Performance, breast meat yield and abdominal fat deposition of male broiler chickens fed diets supplemented with DL-methionine or DL-methionine hydroxy analogue free acid. *Br. Poult. Sci.* 38:397-404.
- Huyghebaert, G. 1993. Comparison of DL-methionine and methionine hydroxy analogue-free acid in broilers by using multi exponential regression models. *Br. Poult. Sci.* 34:351-359.
- Huyghebaert, G., and P. J. W. Van Schagen. 1989. Relative biopotency of methionine sources for broilers, as measured by means of a multi-exponential regression model. Page 299 in *Proceedings of the 7th European Symposium on Poultry*

- Nutrition. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Lloret de Mar, Spain.
- Knight, C. D., and J. J. Dibner. 1984. Comparative absorption of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid and L-methionine in the broiler chick. *J. Nutr.* 114:2179-2186.
- Koban, H. G., and E. Koberstein. 1984. Kinetics of hydrolysis of dimeric and trimeric methionine hydroxy analogue free acid under physiological conditions of pH and temperature. *J. Agric. Food Chem.* 32:393-396.
- Lawson, C. Q., and F. J. Ivey. 1986. Hydrolysis of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid dimer in two model systems. *Poult. Sci.* 65:1749-1753.
- Lemme, A., D. Hoehler, J. J. Brennan, and P. F. Mannion. 2002. Relative effectiveness of methionine hydroxy analog compared to DL-methionine in broiler chickens. *Poult. Sci.* 81:838-845.
- Lerner, J., S. Yankelowitz, and M. W. Taylor. 1969. The intestinal absorption of methionine in chickens provided with permanent Thiry-Vella fistulas. *Experientia* 25:689-691.
- Maenz, D. D., and C. M. Engele-Schaan. 1996a. Methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid are transported by distinct Na⁺-dependent systems in the brush border membrane of the chick intestinal epithelium. *J. Nutr.* 126:529-536.
- Maenz, D. D., and C. M. Engele-Schaan. 1996b. Methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid are partially converted to nonabsorbed compounds during passage through the small intestine and heat exposure does not affect small intestinal absorption of methionine sources in broiler chicks. *J. Nutr.* 126:1438-1444.
- Ogihara, H., H. Saito, B. Shin, T. Terada, S. Takenoshita, Y. Nagamachi, K. Inui, and K. Takata. 1996. Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:848-852.
- Ontiveros, R. R., W. D. Shermer, and R. A. Berner. 1997. An HPLC method for the determination of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid (HMB) in supplemented animal feeds. *J. Agric. Food Chem.* 35:692-694.
- Pan, Y., E. A. Wong, J. J. Dibner, M. Vázquez-Añón, and K. E. Webb. 2002. Poly(A)⁺ RNA encoding proteins capable of transporting L-methionine and/or DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid are present in the intestinal mucosa of broilers. *J. Nutr.* 132:382-386.
- Rostagno, H. S., and W. A. Barbosa. 1995. Biological efficacy and absorption of DL-methionine hydroxy analogue free acid compared to DL-methionine in chickens as affected by heat stress. *Br. Poult. Sci.* 36:303-312.
- Saunderson, C. L. 1991. Metabolism of methionine and its nutritional analogs. *Poult. Int.* 30:34-38.
- Soriano-García, J. F., M. Torras-Llort, R. Ferrer, and M. Moretó. 1998. Multiple pathways for L-methionine transport in brush-border membrane vesicles from chicken jejunum. *J. Physiol.* 509:527-539.
- Soriano-García, J. F., M. Torras-Llort, M. Moretó, and R. Ferrer. 1999. Regulation of L-methionine and L-lysine uptake in chicken jejunal brush-border membrane by dietary methionine. *Am. J. Physiol.* 277:R1654-R1661.
- Sturkei, P. D. 1986. Secretion and digestion. Pages 289-302 in *Avian Physiology*. P. D. Sturkei, ed. Springer-Verlag, New York.
- Thomas, O. P., C. Tamplin, S. D. Crissey, E. Bossard, and A. Zuckerman. 1991. An evaluation of methionine hydroxy analogue free acid using a nonlinear (exponential) bioassay. *Poult. Sci.* 70:605-610.
- Thwaites, D. T., and B. C. Stevens. 1999. H⁺-zwitterionic amino acid symport at the brush-border membrane of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Exp. Physiol.* 84:275-284.
- Van Weerden, E. J., J. B. Schutte, and H. L. Bertram. 1992. Utilization of the polymers of methionine hydroxy analogue free acid (MHA-FA) in broiler chicks. *Arch. Geflügelkd.* 56:63-68.
- Vinardell, M. P., M. T. Lopera, and M. Moretó. 1986. Absorption of 3-oxy-methyl-D-glucose by chicken caecum and jejunum in vivo. *Comp. Biochem. Physiol. A* 85:171-173.
- Wilson, T. H., and G. Wiseman. 1954. Metabolic activity of the small intestine of the rat and golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Physiol.* 123:126-130.

Conversion of the Methionine Hydroxy Analogue, DL-2-Hydroxy-(4-Methylthio) butanoic Acid, to Sulfur-Containing Amino Acids in the Chicken Small Intestine¹

R. Martín-Venegas*, P. A. Geraert† and R. Ferrer*,²

*Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028-Barcelona;

and †Adisseo France S.A.S., 92160-Antony, France

ABSTRACT DL-methionine (DL-Met) or its corresponding hydroxy analogue, DL-2-hydroxy-(4-methylthio) butanoic acid (DL-HMB), are commonly added to commercial animal diets to satisfy the total sulfur amino acid requirement. The utilization of DL-HMB as a supplementary source of Met begins with its conversion to L-Met via a two step-mediated process. L-Met can then be transsulfurated to L-cysteine (L-Cys), which in turn, can be catabolized to taurine (Tau). In the present study, the capacity of the chicken small intestine to convert DL-HMB to L-Met and to use this amino acid as a source for L-Cys and Tau production has been evaluated. The appearance of Met in the serosal compartment of everted sacs incubated with DL-HMB is higher in the presence of an H⁺-gradient (mucosal pH 5.5 versus 7.4). Serosal Cys and Tau concentration was compared in everted sacs incubated at a mucosal pH of 5.5 with DL-HMB or L-Met, and the results show significantly higher values after incubation with the hydroxy analogue. Regional comparisons indicate no significant differences in the appearance of serosal Met and Cys, although lower values were obtained for Tau in the duodenum than in the jejunum and ileum. The profile of non-sulfur amino acids was also determined and revealed no significant differences between DL-HMB and L-Met incubated sacs. In conclusion, Cys and Tau content in chicken enterocytes is higher when DL-HMB is used as a Met source.

Key words: DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid, methionine hydroxy analogue, cysteine, taurine, chicken small intestine

INTRODUCTION

Synthetic sources of dietary methionine (**Met**), such as DL-Met or its corresponding commonly added to commercial animal diets to satisfy the total sulfur amino acid requirement for growth and maintenance. The bioefficacy of DL-HMB hydroxy analogue DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid

(**DL-HMB**), are compared with DL-Met has been the subject of numerous studies (Thomas et al., 1991; Esteve-Garcia and Austic, 1993; Huyghebaert, 1993; Rostagno and Barbosa, 1995; Maenz and Engele-Schaan, 1996; Esteve-Garcia and Llauroadó, 1997; Lemme et al., 2002) and remains controversial today. Differences in intestinal absorption and metabolism of DL-Met and DL-HMB would be expected to affect the nutritional utilization of these two Met sources. Commercial DL-HMB contains a significant proportion of non-monomeric forms (Koban and Koberstein, 1984; Lawson and Ivey, 1986), which are poorly absorbed by the chicken intestine (Saunderson, 1991), and have a lower

¹The present study was supported by project 3891 from the Fundació Bosch i Gimpera and Adisseo France S.A.S. and by grant 2005-SGR-0632 from the Generalitat de Catalunya. R. Martín-Venegas holds a Recerca i Docència fellowship from the Universitat de Barcelona. ²Corresponding author: rutferrer@ub.edu

INTESTINAL CONVERSION OF METHIONINE HYDROXY ANALOGUE

biopotency than the monomeric form (Van Weerden et al., 1992). However, we have previously compared *in vivo* and *in vitro* DL-HMB absorption in the chicken intestine with a product containing only the monomer, and found no differences resulting from the high hydrolytic capacity of the intestinal mucosa (Martín-Venegas et al., 2006).

Upon absorption, DL-HMB must be converted into L-Met for effective utilization. Although there are extensive studies on the absorption of DL-HMB, relatively few studies have examined its metabolism in the chicken intestine. The conversion of this synthetic source to the biologically active amino acid involves two enzymatic steps: oxidation of the α -carbon followed by transamination. The first reaction in the conversion of DL-HMB to L-Met is a stereospecific oxidation involving different enzymes: peroxisomal L-2-hydroxy acid oxidase (L-HAOX) and mitochondrial D-2-hydroxy acid dehydrogenase (D-HADH), which catalyzes the oxidation of L-HMB and D-HMB, respectively (Dibner and Knight, 1984), thereby yielding the corresponding α -keto acid, 2-keto-(4-methylthio)butanoic acid (KMB). The specific enzyme L-HAOX has been found in chicken liver and kidney (Gordon andSizer, 1965), whereas D-HADH has been detected in numerous tissues, including liver, kidney, skeletal muscle, intestine, pancreas, spleen and brain (Dibner and Knight, 1984). Subsequent to the formation of the common intermediate KMB, the second step is its conversion to L-Met by transamination, which is ubiquitous and does not constitute the limiting step in the complete conversion process of DL-HMB (Harter and Baker, 1977; Knight and Dibner, 1984; Rangel-Lugo and Austic, 1998).

L-Met is a nutritionally indispensable amino acid needed for many important metabolic functions: 1) protein synthesis; 2) transmethylation to form S-

adenosylmethionine, a primary methyl donor that methylates compounds to form such products as creatine and phosphatidylcholine, and which also participates in polyamine synthesis; and 3) transsulfuration to form L-cysteine (**L-Cys**), which in turn is also a precursor amino acid for protein synthesis, and which can be incorporated into glutathione or catabolized to taurine (**Tau**). As a glutathione precursor, L-Cys plays a key role in intestinal epithelial antioxidant functions, and may also regulate epithelial cell proliferation via modulation of redox status (Shoveller et al., 2005). Tau is involved in many physiological functions including osmoregulation, detoxification and antioxidation (Huxtable, 1992; O'Flaherty, 1997; Lambert, 2004; Roig-Pérez et al., 2005).

For many decades, the liver has been identified as the primary organ involved in dietary amino acid metabolism, with the role of the intestine restricted to digestion and the absorption of dietary constituents. Nevertheless, recent evidence supports the view that the intestinal epithelium obtains a substantial fraction of its metabolic energy from the catabolism of dietary amino acids and, moreover, processes absorbed amino acids before their entry into portal circulation, thereby determining their systemic availability (Brosnan, 2003; Young, 2004; Shoveller et al., 2005). Thus, it can be hypothesized that the conversion of DL-HMB to L-Met and further intestinal metabolism may be involved in the nutritional efficiency of this Met source. For this reason, the aim of the present research was first to evaluate serosal Met appearance after DL-HMB incubation in everted sacs from the chicken small intestine; secondly, to compare the serosal appearance of Cys and Tau after DL-HMB and L-Met incubation; and finally, to compare free amino acid patterns in response to incubation with both Met sources.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Zoletil® (tiletamine-zolazepam) was obtained from Virbac (France). DL-HMB was supplied by Adisseo France, S.A.S. (Antony, France) as Rhodimet™ AT88 (88% of active substance).

Animals and diets

Male Ross chickens (*Gallus gallus domesticus* L.), obtained from Granja Crusvi (Montblanc, Catalonia), were raised at standardized temperature (26-28 °C), humidity (40-60 %) and light (L:D, 16:8) at a density of about 1 chicken/500 cm². The birds were fed ad libitum from hatching to d 18-21 with balanced diets (Table 1) formulated and prepared by IRTA-Mas Bové (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Generalitat de Catalunya, Reus, Catalonia). These diets were supplemented with DL-Met or DL-HMB (Rhodimet™ AT88) on an equimolar Met basis taking into account that DL-Met source is 99% pure and DL-HMB source is 88% pure. Experiments with DL-HMB or L-Met as substrate were performed on 18-21-day-old animals fed DL-HMB or DL-Met, respectively. The experimental protocol was approved by the Experimental Animal Ethical Research Committee of the Universitat de Barcelona, in accordance with the current regulations for the use and handling of experimental animals (Decret 214/97, Generalitat de Catalunya).

Transport experiments

Everted sacs were prepared following Wilson and Wiseman (1954) as previously described (Martín-Venegas et al., 2006). Briefly, the chickens were anaesthetized with 60 mg/kg Zoletil® and killed by decapitation without previous starvation. A portion of the duodenum (pancreatic loop), jejunum (6 cm proximal and distal to Meckel's diverticulum)

and ileum (the region connected with mesentery to the caeca) was removed and immediately flushed with ice-cold saline solution (4°C). The intestinal segments were turned inside out and cut into four portions of about 3 cm in length. Each portion was tied at the ends to form a sac, and was filled with the serosal medium and incubated for 30 min at 37°C in 15 mL of the mucosal medium, which was continuously gassed with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). At the end of the incubation, the sacs were dried, weighed and their content carefully drained. The empty sacs were then weighed again and the decrease in weight was taken as the volume of fluid remaining after incubation. The serosal content was then centrifuged (16,000 x g for 5 min at 4 °C) and the supernatant stored at -80°C until measurement. The mucosal medium was a Krebs-Henseleit bicarbonate buffer, which contained (in mmol/L): 118 NaCl, 4.74 KCl, 1.18 MgSO₄·7H₂O, 1.27 CaCl₂, 1.18 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃ and 7 DL-HMB or L-Met, gassed with carbogen until pH 7.4. For the experiments performed at pH 5.5, bicarbonate was replaced by 2-(4-morpholino)ethanesulfonic acid and pH was adjusted with Tris. In all the experiments, the serosal medium was the bicarbonate buffer (pH 7.4) without substrate. The pH of all solutions was maintained during incubation. Results were normalized to the weight of the empty sac after incubation and expressed as nmol/100 mg tissue.

Amino acid quantification

Quantitative analysis of amino acids was carried out by ion exchange chromatography following the methodology described by Moore, Spackman and Stein (1958). The analyzer (amino acid analyzer Amersham Pharmacia LKB Biotech-Biochrom, model Alpha Plus, UK) was equipped with a cation exchange column (sulphonate polystyrene divinyl-benzene resin, 5µm particle size and 200 x 4 mm in length and internal diameter,

INTESTINAL CONVERSION OF METHIONINE HYDROXY ANALOGUE

respectively; Biochrom, Cambridge, UK). Chromatographic runs were made by using the lithium citrate buffer gradient and temperature gradient recommended by the manufacturer for physiological fluids. The eluate was mixed with ninhydrin-hydrindantin reagent and the reaction with amino acids was allowed to run in a coil at 135 °C. In these conditions, amino acids form colored derivatives with absorption peaks at 570 nm and 440 nm for amino acids and imino acids, respectively. The different amino acids were identified by their retention time, via comparison with an amino acid standard solution of known composition run in the same batch, and quantified by comparison of its peak areas with those of the standard.

Data analysis

The results are reported as means $\pm$ SEM. All data were compared by ANOVA using SPSS® software (SPSS Inc. Chicago, IL). $P < 0.05$ was considered to denote significance.

RESULTS

Met serosal appearance was determined in DL-HMB incubated sacs from the duodenum, jejunum and ileum at a mucosal pH of 5.5 and 7.4, after 30 min incubation. The results (Figure 1) show a higher serosal appearance in the presence of an H^+ -gradient along the chicken small intestine, although no significant differences were detected in the jejunum. The regional profile for each pH revealed no significant differences, except at a pH of 7.4 where the results show lower values in the duodenum than in the jejunum and no differences between these segments and the ileum. Taking into account the pH effect observed, further experiments were only performed in the presence of an H^+ -gradient.

The results of Cys serosal appearance (Figure 2) show, in the three intestinal segments, significantly higher values after DL-HMB incubation than after L-Met incubation. Regarding the regional profile, statistical

analysis indicated no significant differences ($P \geq 0.05$) between intestinal segments in either substrate.

Tau serosal appearance in the duodenum, jejunum and ileum is shown in Figure 3. As with the Cys results, following DL-HMB incubation, the data reveal significantly higher values than those obtained with L-Met. For both substrates, the duodenum shows the lowest values in comparison with the more distal regions.

The serosal appearance of non-sulfur amino acids, which are shown in the order that they appear in the chromatogram, shows no statistical differences in all the intestinal segments following DL-HMB or L-Met incubation (Table 2), suggesting that amino acid serosal appearance was not affected by the Met source employed. Comparison of the results shown in Figures 1, 2, 3 and Table 2 indicates that Tau is the more concentrated free amino acid in the serosal compartment. In contrast, the serosal concentrations of Met and Cys were lower than most of the other amino acids.

DISCUSSION

Met is a limiting essential amino acid in animal diets. To meet the nutritional requirement of this amino acid, dietary supplementation with synthetic sources of Met, such as DL-Met or DL-HMB, is a common practice in animal feed production. To be efficiently utilized, both DL-Met and DL-HMB must be absorbed from the intestinal lumen and then metabolized to L-Met. The present study examines sulfur amino acids serosal appearance in everted sacs as an indicator of their systemic availability.

Conversion of DL-HMB to L-Met is a complex process involving different enzymatic mechanisms. Although studies performed with DL-HMB as substrate for L-Met synthesis

INTESTINAL CONVERSION OF METHIONINE HYDROXY ANALOGUE

have shown that the liver accounts for the majority of total body conversion, the kidney and small intestine, among other tissues, also substantially participate in DL-HMB metabolism (Gordon and Sizer, 1965; Langer, 1965; Dupuis et al., 1989 and 1990; Wang et al., 1991; Dibner and Ivey, 1992; Song et al., 2001). Therefore, some of the dietary DL-HMB will already be converted to L-Met and utilized by the intestine, thus maintaining a favorable gradient for DL-HMB absorption by preventing its intracellular accumulation (Dibner and Knight, 1984). In chickens, KMB conversion to L-Met has been discounted as the limiting step in this process (Harter and Baker, 1977; Knight and Dibner, 1984; Rangel-Lugo and Austic, 1998), since a wide variety of amino acids could serve as substrates for transamination (Rangel-Lugo and Austic, 1998). These authors reported an intermediate activity of the liver and intestinal mucosa, since the kidney remains the most active organ. The results of the present study support the existence of substantial DL-HMB conversion to Met along the chicken small intestine. Moreover, Met appearance after DL-HMB incubation is higher in the presence of an H^+ -gradient. We have previously demonstrated, using the same experimental conditions, higher serosal DL-HMB appearance at a mucosal pH of 5.5 (Martín-Venegas et al., 2006), which suggests a direct relationship between substrate transport and conversion to Met. In addition, we have also observed the lowest DL-HMB serosal appearance values in the duodenum, when compared with the jejunum and ileum. However, similar Met serosal appearance after DL-HMB incubation were found (Figure 1), thus suggesting that the duodenum has a high capacity to convert DL-HMB to L-Met. In this sense, Brachet and Puigserver (1992) described an important activity of the enzyme responsible for the conversion of D-Met to L-Met in the chicken small intestine, with the

highest activity occurring in the duodenal mucosa.

L-Met, L-Cys and Tau are metabolically linked via the unidirectional transsulfuration pathway. The cellular content of L-Cys and Tau in various tissues is thought to be maintained by their absorption and biosynthesis, as well as by their efficient removal (Shimizu and Satsu, 2000; Stipanuk, 2004). L-Cys and Tau homeostasis in response to dietary changes appears to be primarily maintained by the liver (Ide et al., 2002; Stipanuk et al., 2002), although the contribution of non-hepatic tissues to further L-Met metabolism should also be considered (Stipanuk et al., 2002). Indeed, the complete transsulfuration pathway is present not only in the liver, but also in the kidney, small intestine and pancreas (Finkelstein, 1998). Our results indicate that Cys and Tau serosal appearance differ with the Met source assayed, which suggests the contribution of the dietary sulfur amino acid content to the regulation of L-Cys and Tau systemic availability immediately upon absorption. Regarding the regional profile, the appearance of Cys shows no differences. In contrast, Tau content, like Met serosal appearance, is significantly the lowest in the duodenum, following the same previously reported profile as DL-HMB transport in the chicken small intestine (Martín-Venegas et al., 2006). All these data suggest that the intestinal metabolism of dietary DL-HMB is nutritionally relevant. In fact, the sum of Met, Cys and Tau appearing at the serosal compartment in DL-HMB incubated sacs, taking into account DL-HMB appearing at the serosal compartment in the same experimental conditions (Martín-Venegas et al., 2006), reveals a conversion of DL-HMB to sulfur-containing amino acids of 71, 59 and 63 % in the duodenum, jejunum and ileum, respectively, thus confirming the high contribution of the duodenum.

INTESTINAL CONVERSION OF METHIONINE HYDROXY ANALOGUE

Rat small intestinal cells are very active in the metabolism of dietary L-Cys, since high levels of this amino acid adversely affect the viability of the enterocytes (Coloso and Stipanuk, 1989). In contrast, Tau is the most abundant intracellular free amino acid (O'Flaherty, 1997), possessing many protective cellular functions (Huxtable, 1992; Lambert, 2004). Therefore, it can be hypothesized that in the chicken intestine L-Cys might be diverted to Tau synthesis. In fact, Bella and Stipanuk (1995) reported that the formation of Tau versus sulfate as the end product of L-Cys hepatic catabolism represents a metabolic compensation minimizing the acid load in rats fed excess sulfur amino acids. In this way, although metabolic L-Cys deviation to Tau synthesis in the intestine is described to be lower than in the liver (Coloso and Stipanuk, 1989), incubation with an organic acid such as DL-HMB produces higher Tau levels than those detected with L-Met. In this way, DL-HMB has not only a potential as Met source but also could be more easily involved in detoxication process through the transsulfuration pathway. Therefore, the contribution of the small intestine to the total body transsulfuration capacity should be taken into consideration. Moreover, the intestinal epithelium of chickens encounters hyperosmotic luminal fluids during the digestion process (Mongin, 1976) and one of the functions of Tau is thought to be osmoregulation (Wright et al., 1986; Huxtable, 1992). Shimizu and Satsu (2000) reported an increase in Tau content when Caco-2 cells, an intestinal human cell line, were exposed to hypertonic stress. Therefore, an increased level of Tau after DL-HMB incubation, in comparison with L-Met, would be favorable to homeostasis maintenance in post-prandial periods.

The intestinal epithelium is a highly dynamic system continuously renewed by a process involving cell proliferation and differentiation,

and obtains a substantial fraction of its metabolic energy from the catabolism of dietary amino acids. Additionally, the intestinal epithelium is known to catabolize a significant portion of dietary amino acids, including Met, thereby modulating the amino acid availability to other tissues (Wu, 1998). Thus, it becomes important to dispose of not only sulfur amino acids, but also of all other amino acids. For these reasons, free amino acid patterns in response to incubation with both Met sources were also determined. The results show no differences in the intestinal free amino acid patterns following L-Met or DL-HMB incubation, which suggests that the intake of either of these substrates does not compromise the availability of non-sulfur amino acids. Accordingly, Song et al. (2001) described that the infusion of either DL-Met or DL-HMB had no effect on hepatic metabolism of amino acids other than that of Met.

In summary, our results not only confirm the capacity of the intestine to convert DL-HMB to Met, but also show a direct relation between the transport of this hydroxy analogue and its conversion. Moreover, Cys and Tau synthesis after incubation with DL-HMB is higher when compared to L-Met incubation. Therefore, the data indicate that Cys and Tau formation by chicken enterocytes could be favored when DL-HMB is used as a Met source, thereby suggesting that the hydroxy analogue might be preferentially diverted to the transsulfuration pathway. Nevertheless, the mechanism underlying these differences warrants further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Enric Esteve from IRTA-Mas Bové for diet preparation and discussions on efficacy of dietary methionine sources. The valuable help of the Serveis Científicotècnics of the Universitat de Barcelona is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Bella, D. L., and M. H. Stipanuk. 1995. Effects of protein, methionine, or chloride on acid-base balance and on cysteine catabolism. *Am. J. Physiol.* 269:E910-E917.
- Brachet, P., and A. Puigserver. 1992. Regional differences for the D-amino acid oxidase-catalysed oxidation of D-methionine in chicken small intestine. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 101:509-511.
- Brosnan, J. T. 2003. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J. Nutr.* 133: 2068S-2072S.
- Coloso, R. M., and Stipanuk, M. H. 1989. Metabolism of cyst(e)ine in rat enterocytes. *J. Nutr.* 119:1914-1924.
- Dibner, J. J., and F. J. Ivey. 1992. Capacity in the liver of the broiler chick for conversion of supplemental methionine activity to L-methionine. *Poult. Sci.* 71:700-708.
- Dibner, J. J., and C. D. Knight. 1984. Conversion of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid to L-methionine in the chick: a stereospecific pathway. *J. Nutr.* 114:1716-1723.
- Dupuis, L., P. Brachet, and A. Puigserver. 1990. Oxidation of the supplemental methionine source L-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid by pure L-2-hydroxy acid oxidase from chicken liver. *J. Nutr.* 120:1171-1178.
- Dupuis, L., C.L. Saunderson, A. Puigserver, and P. Brachet. 1989. Oxidation of methionine and 2-hydroxy 4-methylthiobutanoic acid stereoisomers in chicken tissues. *Br. J. Nutr.* 62:63-75.
- Esteve-Garcia, E., and R. E. Austic. 1993. Intestinal absorption and renal excretion of dietary methionine sources by the growing chicken. *J. Nutr. Biochem.* 4:576-587.
- Esteve-Garcia, E., and L. L. Llauroadó. 1997. Performance, breast meat yield and abdominal fat deposition of male broiler chickens fed diets supplemented with DL-methionine or DL-methionine hydroxy analogue free acid. *Br. Poult. Sci.* 38:397-404.
- Finkelstein, J. D. 1998. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur. J. Pediatr.* 157:S40-S44.
- Gordon, R. S., and I. W. Sizer. 1965. Conversion of methionine hydroxy analogue to methionine in the chick. *Poult. Sci.* 44:673-678.
- Harter, J. M., and D. H. Baker. 1977. Sulfur amino acid activity of glutathione, DL- α -hydroxy-methionine, and α -keto-methionine in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 156:201-204.
- Huxtable, R. J. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72:101-163.
- Huyghebaert, G. 1993. Comparison of DL-methionine and methionine hydroxy analogue-free acid in broilers by using multi exponential regression models. *Br. Poult. Sci.* 34:351-359.
- Ide, T., M. Kushiro, Y. Takahashi, K. Shinohara, and S. Cha. 2002. MRNA expression of enzymes involved in taurine biosynthesis in rat adipose tissues. *Metabolism.* 51:1191-1197.
- Knight, C. D., and J. J. Dibner. 1984. Comparative absorption of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid and L-methionine in the broiler chick. *J. Nutr.* 114:2179-2186.
- Koban, H. G., and E. Koberstein. 1984. Kinetics of hydrolysis of dimeric and trimeric methionine hydroxy analogue free acid under physiological conditions of pH and temperature. *J. Agric. Food Chem.* 32:393-396.
- Lambert, I. H. 2004. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem. Res.* 29:27-63.
- Langer, B. W. 1965. The biochemical conversion of 2-hydroxy-4-methylthiobutyric acid into methionine by the rat in vitro. *Biochem. J.* 95:683-687.

INTESTINAL CONVERSION OF METHIONINE HYDROXY ANALOGUE

- Lawson, C. Q., and F. J. Ivey. 1986. Hydrolysis of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid dimer in two model systems. *Poult. Sci.* 65:1749-1753.
- Lemme, A., D. Hoehler, J. J. Brennan, and P. F. Mannion. 2002. Relative effectiveness of methionine hydroxy analog compared to DL-methionine in broiler chickens. *Poult. Sci.* 81:838-845.
- Maenz, D. D., and C. M. Engele-Schaan. 1996. Methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid are partially converted to nonabsorbed compounds during passage through the small intestine and heat exposure does not affect small intestinal absorption of methionine sources in broiler chicks. *J. Nutr.* 126:1438-1444.
- Martín-Venegas, R., J. F. Soriano-García, M. P. Vinardell, P. A. Geraert, and R. Ferrer. 2006. Oligomers are not the limiting factor in the absorption of DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid in the chicken small intestine. *Poult. Sci.* 85:56-63.
- Mongin, P. 1976. Ionic constituents and osmolality of the intestinal fluids of the laying hen. *Br. Poult. Sci.* 17:383-392.
- Moore, S., D. H. Spackman, and W. H. Stein. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed. Proc.* 17:1107-1115.
- O'Flaherty, L., P. P. Stapleton, H. P. Redmond, and D. J. Bouchier-Hayes. 1997. Intestinal taurine transport: a review. *Eur. J. Clin. Invest.* 27:873-880.
- Rangel-Lugo, M., and R. E. Austic. 1998. Transamination of 2-oxo-4-(methylthio)butanoic acid in chicken tissues. 1998. *Poult. Sci.* 77:98-104.
- Roig-Pérez, S., M. Moretó, and R. Ferrer. 2005. Transepithelial taurine transport in Caco-2 cell monolayers. *J. Membr. Biol.* 204:85-92.
- Rostagno, H. S., and W. A. Barbosa. 1995. Biological efficacy and absorption of DL-methionine hydroxy analogue free acid compared to DL-methionine in chickens as affected by heat stress. *Br. Poult. Sci.* 36:303-312.
- Saunderson, C. L. 1991. Metabolism of methionine and its nutritional analogs. *Poult. Int.* 30:34-38.
- Shimizu, M., and H. Satsu. 2000. Physiological significance of taurine and the taurine transporter in intestinal epithelial cells. *Amino Acids.* 19: 605-614.
- Shoveller, A. K., B. Stoll, R. O. Ball, and D. G. Burrin. 2005. Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *J. Nutr.* 135:1609-1612.
- Song, Z., K. Beers, J. J. Dibner, M. Vázquez-Añón, R. McNew, and W. Bottje. 2001. The hepatic extraction of plasma free amino acids and response to hepatic portal venous infusion of methionine sources in anesthetized SCWL males (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 130:237-250.
- Stipanuk, M. H., M. Londono, J. Lee, M. Hu, and A. F. Yu. 2002. Enzymes and metabolites of cysteine metabolism in nonhepatic tissues of rats show little response to changes in dietary protein or sulfur amino acids levels. *J. Nutr.* 132:3369-3378.
- Stipanuk, M. H. 2004. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* 24:539-577.
- Thomas, O. P., C. Tamplin, S. D. Crissey, E. Bossard, and A. Zuckerman. 1991. An evaluation of methionine hydroxy analogue free acid using a nonlinear (exponential) bioassay. *Poult. Sci.* 70:605-610.
- Van Weerden, E. J., J. B. Schutte, and H. L. Bertram. 1992. Utilization of the polymers of methionine hydroxy analogue free acid (MHA-FA) in broiler chicks. *Arch. Geflügelkd.* 56:63-68.
- Wang, S., W. G. Bottje, Z. Song, K. Beers, M. Vázquez-Añón, and J. J. Dibner. 2001. Uptake of DL-2-hydroxy-4-methylthio-

INTESTINAL CONVERSION OF METHIONINE HYDROXY ANALOGUE

- butanoic acid (DL-HMB) in the broiler liver in vivo. Poult. Sci. 80:1619-1624.
- Wilson, T. H., and G. Wiseman. 1954. Metabolic activity of the small intestine of the rat and golden hamster (*Mesocricetus auratus*). J. Physiol. 123:126-130.
- Wright, C. E., H. H. Tallan, Y. Y. Lin, and G. E. Gaull. 1986. Taurine: biological update. Annu. Rev. Biochem. 55:427-453.
- Wu, G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. J. Nutr. 128:1249-1952.
- Young, V. R. 2004. Introduction to the 3rd Amino Acid Assessment Workshop. J. Nutr. 134:1555S-1557S.

INTESTINAL CONVERSION OF METHIONINE HYDROXY ANALOGUE

Table 1. Composition of the experimental diets

Ingredients	g/kg diet
Wheat (13.9 % CP)	156.35
Maize (8.5 % CP)	301.56
Lard	30.00
Peas (20.2 % CP)	180.00
Soybean meal (47.5 % CP)	180.84
Full fat extruded soybeans (35.3 % CP)	111.08
L-lysine HCl	0.35
Calcium carbonate	11.79
Dicalcium phosphate	19.34
Sodium chloride	4.55
Minerals and vitamins ¹	4.00
Choline chloride (50% purity)	0.15
Nicarbazin	0.125
Nutrient composition calculated	
Crude protein	208.00
Crude fiber	35.00
Ether extract	70.00
Lysine	12.10
Methionine	2.90
Cysteine	3.30
DL-Met or DL-HMB²	2.4 / 2.66
Threonine	7.70
Tryptophan	2.20
Calcium	10.00
Total phosphorus	7.10
Inorganic phosphorus	4.50
Sodium	1.20
Chloride	2.90
Me (kcal/kg diet)	3050

¹One kg of diet contains: vitamin A, 12,000 IU (retinyl acetate); cholecalciferol, 2,400 IU; vitamin E, 30 IU (DL- α -tocopheryl acetate); vitamin B₁, 2.2 mg; vitamin B₂, 8 mg; vitamin B₆, 5 mg; vitamin B₁₂, 11 μ g; folic acid, 1.5 mg; biotin, 150 μ g; Ca pantothenate, 25 mg; nicotinic acid, 65 mg; Mn, 60 mg; Zn, 40 mg; I, 0.33 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Se, 0.15 mg; ethoxyquin, 150 mg

²DL-Met or DL-HMB (DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid) as a synthetic source of methionine

INTESTINAL CONVERSION OF METHIONINE HYDROXY ANALOGUE

Table 2. Non-sulfur amino acid serosal appearance in everted sacs after DL-HMB or L-Met incubation¹

	DUODENUM		JEJUNUM		ILEUM	
	DL-HMB	L-Met	DL-HMB	L-Met	DL-HMB	L-Met
Asp	26.6 ± 3.6	25.7 ± 6.8	28.7 ± 1.5	28.9 ± 1.5	27.3 ± 2.3	25.8 ± 2.0
Thr	15.0 ± 3.0	15.0 ± 3.2	13.6 ± 0.9	13.4 ± 1.6	9.8 ± 1.2	9.5 ± 1.4
Ser	29.9 ± 3.9	29.8 ± 3.0	22.6 ± 1.4	20.2 ± 1.9	17.5 ± 2.3	18.0 ± 3.0
Glu	49.9 ± 3.5	47.5 ± 2.6	46.7 ± 2.5	47.4 ± 3.3	44.2 ± 3.6	44.6 ± 4.4
Gln	33.4 ± 2.3	33.0 ± 1.8	41.6 ± 2.8	40.5 ± 4.0	43.7 ± 3.9	44.6 ± 3.3
Pro	18.3 ± 3.2	18.2 ± 1.4	15.9 ± 2.4	15.5 ± 2.1	12.2 ± 1.0	11.2 ± 1.1
Gly	50.3 ± 6.2	49.4 ± 8.1	32.4 ± 2.2	32.1 ± 3.6	30.4 ± 2.1	30.3 ± 2.3
Ala	46.0 ± 3.3	45.0 ± 2.1	42.7 ± 3.6	40.1 ± 4.5	38.5 ± 3.5	38.2 ± 2.2
Val	17.5 ± 3.4	18.4 ± 3.2	10.8 ± 1.1	8.1 ± 1.0	9.2 ± 1.5	8.6 ± 0.9
Ile	11.6 ± 1.9	10.6 ± 1.9	6.4 ± 0.6	5.9 ± 0.8	5.7 ± 1.1	5.8 ± 1.0
Leu	18.9 ± 2.8	18.3 ± 2.7	12.2 ± 1.1	13.0 ± 1.1	10.0 ± 1.4	10.6 ± 1.6
Tyr	8.1 ± 0.8	7.6 ± 1.5	6.0 ± 0.6	6.0 ± 1.6	5.3 ± 1.4	5.0 ± 1.0
Phe	8.4 ± 1.4	8.1 ± 1.7	8.2 ± 0.7	8.1 ± 1.4	7.4 ± 0.6	6.3 ± 0.7
Orn	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.3	2.0 ± 0.3	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2
Lys	15.4 ± 2.4	15.4 ± 3.0	11.7 ± 0.9	10.9 ± 1.5	10.2 ± 1.3	9.1 ± 1.0
His	4.5 ± 0.5	4.1 ± 0.6	3.5 ± 0.3	3.6 ± 0.5	3.3 ± 0.4	3.0 ± 0.8
Arg	7.9 ± 2.1	7.4 ± 1.3	9.3 ± 0.6	8.0 ± 0.7	8.0 ± 1.0	8.4 ± 0.9

¹Non-sulfur amino acid serosal appearance in everted sacs incubated for 30 min with 7 mmol/L DL-HMB or L-Met in the mucosal compartment at a mucosal pH of 5.5. The amino acids are shown in the order of appearance in the chromatogram. The results are expressed as the mean ± SEM of n = 7 sacs for the duodenum and n = 9 for the jejunum and ileum. There were no significant differences ($P \geq 0.05$) between substrates.

INTESTINAL CONVERSION OF METHIONINE HYDROXY ANALOGUE

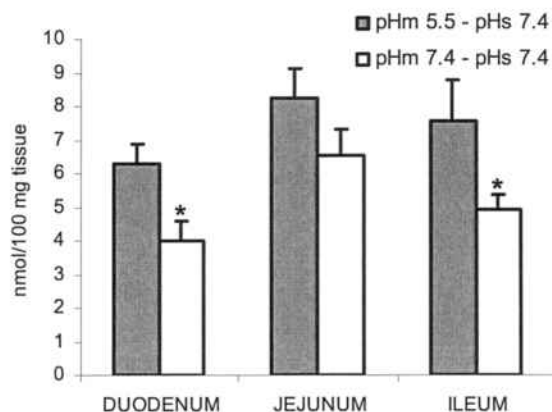


Figure 1. Met serosal appearance in everted sacs incubated for 30 min with 7 mmol/L DL-HMB in the mucosal compartment in the presence (pHm 5.5 – pHs 7.4) or absence (pHm 7.4 – pHs 7.4) of an H^+ -gradient. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of $n = 8$ sacs for the duodenum and $n = 13$ for the jejunum and ileum. *Mean differences between pH conditions ($P < 0.05$). The regional profile revealed no significant differences, except at a pH of 7.4 where the results show lower values in the duodenum than in the jejunum and no differences between these segments and the ileum ($P \geq 0.05$).

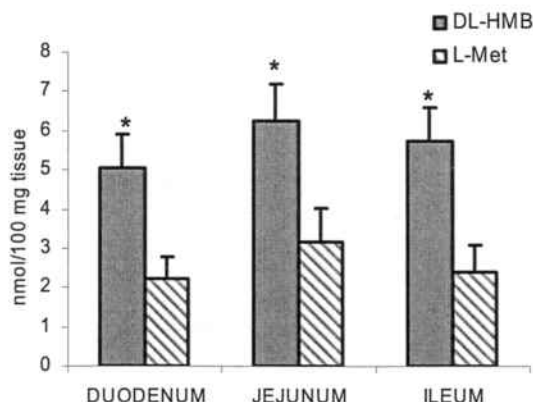


Figure 2. Cys serosal appearance in everted sacs incubated for 30 min with 7 mmol/L DL-HMB or L-Met in the mucosal compartment at a mucosal pH of 5.5. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of $n = 7$ sacs for the duodenum and $n = 9$ for the jejunum and ileum. *Mean differences between substrates ($P < 0.05$). For both substrates, the regional profile reveals no significant differences.

INTESTINAL CONVERSION OF METHIONINE HYDROXY ANALOGUE

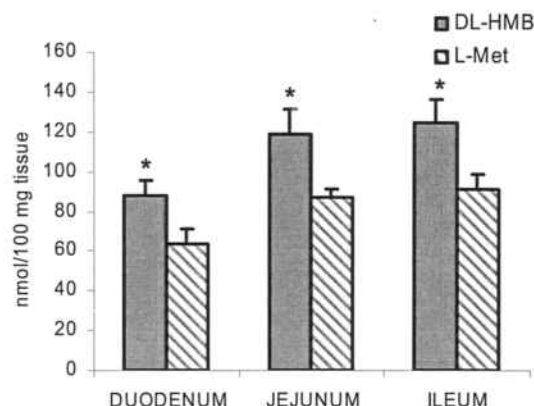


Figure 3. Tau serosal appearance in everted sacs incubated for 30 min with 7 mmol/L DL-HMB or L-Met in the mucosal compartment at a mucosal pH of 5.5. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of $n = 7$ sacs for the duodenum and $n = 9$ for the jejunum and ileum. *Mean differences between substrates ($P < 0.05$). For both substrates, the regional profile reveals the lowest values for the duodenum in comparison with the more distal regions ($P < 0.05$).