



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA DETECCIÓN
DEL SABOR UMAMI EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE
POLLOS BROILER**

Francisca Andrea Díaz Avilés

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: SERGIO ALEJANDRO GUZMÁN PINO
Universidad de Chile

FONDECYT N° 11190569

SANTIAGO, CHILE

2022



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA DETECCIÓN
DEL SABOR UMAMI EN EL TRACTO GASTROINTESINAL DE
POLLOS BROILER**

Francisca Andrea Díaz Avilés

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

NOTA FINAL:

Firma

Profesor Guía:	Sergio Guzmán P.
Profesora Correctora:	Carolina Valenzuela V.
Profesor Corrector:	Jurij Wacyk G.

SANTIAGO, CHILE

2022

Dedicatoria y agradecimientos

Me faltaran paginas para terminar de agradecer a todos y cada uno de los involucrados en esto, pero intentémoslo:

A mi hermosa madre Claudia y familia por ser ese pilar implacable frente a la adversidad de la vida, por estar presente en cada tropiezo que marco un acierto, por cada consejo y sabiduría entregada ayudándome siempre a alcanzar mis metas. El camino de la vida no sería tan ameno de recorrer sin ustedes.

A mis amigos (las ratas chimbomberos más maravillosas), agradezco su infinito apoyo en este proceso que ha llegado a su fin. Este nuevo logro es en gran parte gracias a todos ustedes, a su presencia y palabras de aliento en esta tarea titánica que parecía no tener fin con una pandemia de por medio. Sin ustedes mi vida no seria lo mismo.

A mi profesor guía, Sergio Guzmán Pino, por su apoyo, motivación y enseñanzas durante el desarrollo de la tesis. A Paloma por ser la mejor compañera en este largo proyecto. A mis profesores correctores Carolina y Jurij por su disposición y colaboración.

A Luna (mi fiel compañera de noches de estudio), Doncan, Macho y mis demás doggos, la ignición de este sueño fueron ustedes.

Infinitas gracias

Fran

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN	3
4.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
5.	HIPÓTESIS	9
6.	OBJETIVO GENERAL	9
7.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
8.1	Extracción de ARN	11
8.2	Cuantificación de ARN (Qubit)	11
8.3	Remoción de ADN Genómico	11
8.4	Síntesis de ADNc	12
8.5	Protocolo Q-PCR en tiempo real.....	12
8.6	Obtención de datos y análisis estadístico	13
9.	RESULTADOS	15
9.1	Abundancia relativa de ARNm de T1R1	15
9.2	Abundancia relativa de ARNm de T1R3	16
9.3	Abundancia relativa de ARNm de mGLuR1	17
9.4	Abundancia relativa de ARNm de mGLuR4	18
9.5	Abundancia relativa de ARNm de GPR92.....	19
9.6	Abundancia relativa de ARNm de CASR.....	20
9.7	Abundancia relativa de ARNm de GPR139.....	21
9.8	Abundancia relativa de ARNm de GPRC6A	21
10.	DISCUSIÓN	22
11.	CONCLUSIONES	27
12.	BIBLIOGRAFÍA	28
13.	ANEXOS	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados en el estudio	13
Figura 1. Análisis RT-qPCR de la abundancia relativa de ARNm de T1R1 según efecto edad, tejido e interacción.	15
Figura 2. Análisis RT-qPCR de la abundancia relativa de ARNm de T1R3 según efecto edad, tejido e interacción.	16
Figura 3. Análisis RT-qPCR de la abundancia relativa de ARNm de MGLUR1 según efecto edad, tejido e interacción.	17
Figura 4. Análisis RT-qPCR de la abundancia relativa de ARNm de MGLUR4 según efecto edad, tejido e interacción.	18
Figura 5. Análisis RT-qPCR de la abundancia relativa de ARNm de GPR92 según efecto edad, tejido e interacción.	19
Figura 6. Análisis RT-qPCR de la abundancia relativa de ARNm de CASR según efecto edad, tejido e interacción.	20

1. RESUMEN

La industria avícola lidera el consumo de carne a nivel mundial. Debido a la alta demanda, los sistemas productivos utilizan líneas genéticas con un alto potencial de crecimiento junto con una alimentación óptima que responda a las exigentes demandas fisiológicas de los animales dentro del sistema. Se presume que las aves podrían seleccionar nutrientes a través de receptores gustativos. En esta Memoria de Título, el objetivo fue evaluar la expresión de genes de receptores de compuestos gustativos umami en aves broiler, y su variación en diferentes etapas de vida. Los genes evaluados fueron T1R1, T1R3, mGluR1, mGluR4, GPR92, GPR139, GPRC6A y CaSR. Para llevar a cabo el experimento se usaron 16 aves de la línea broiler Ross 308 de 7 y 26 días respectivamente, a las cuales se les extrajo un total de 10 muestras de tracto gastrointestinal (TGI: base de paladar, base de lengua, buche, proventrículo, molleja, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon). El análisis de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio Centralizado de Investigación Veterinaria (LaCIV) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las muestras fueron procesadas por medio de la utilización de kits siguiendo las indicaciones de los fabricantes para la obtención de ARN y posterior ADNc con la finalidad de llevar a cabo la técnica de PCR en tiempo real. Los resultados de este estudio lograron demostrar la presencia de estos receptores del gusto asociados a la percepción de compuestos de sabor umami, algunos de ellos fueron encontrados a lo largo de todo el TGI, por ejemplo, T1R1, T1R3 y GPR92. Por otro lado, se logró identificar que la expresión génica varió según las edades estudiadas, siendo en algunos genes como T1R1, T1R3, GPR92 y CaSR mayor durante la etapa de 7 días en comparación a la etapa de 26 días ($p < 0,05$). Se concluye que existe expresión diferencial de receptores asociados a la percepción de compuestos de sabor umami en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal de las aves broiler, y, además, esta expresión varía según la edad de las aves, siendo mayor en el grupo de aves de 7 días contra el grupo de 26 días.

Palabras claves: broilers, expresión génica, receptores gustativos, tracto gastrointestinal, umami.

2. ABSTRACT

The poultry industry leads the consumption of meat worldwide. Due to the high demand, the production systems use genetic lines with a high growth potential plus an optimal feeding system that responds to the high physiological demands of the animals within the system. It is hypothesized that birds could select nutrients through taste receptors. In this work, we evaluated the expression of receptor genes for umami taste compounds in broiler chickens, and its variation in the different life stages. The genes evaluated were T1R1, T1R3, mGluR1, mGluR4, GPR92, GPR139, GPRC6A and CaSR. To carry out the experiment, we used 16 birds of the Ross 308 broiler line of 7 and 26 days respectively from which a total of 10 gastrointestinal tract samples were extracted (GIT: base of palate, base of tongue, crop, proventriculus, gizzard, duodenum, jejunum, ileum, cecum, and colon). The analysis of the samples was carried out in the Centralized Veterinary Research Laboratory (LaCIV) of the Faculty of Veterinary and Animal Sciences (FAVET) of Universidad de Chile. The samples were processed through the use of kits following the manufacturer's instructions for obtaining RNA and subsequent cDNA in order to carry out the real-time PCR technique. The results of this study were able to demonstrate the presence of these taste receptors associated with the perception of umami flavor compounds, some of which were found throughout the GIT, e.g. T1R1, T1R3 and GPR92. On the other hand, it was possible to identify that gene expression varied according to the ages studied, being in some genes such as T1R1, T1R3, GPR92 and CaSR higher during the 7-day stage as compared to the 26-day stage ($p < 0,05$). It is concluded that there is differential expression of receptors associated with the perception of umami taste compounds in different sections of the broilers' GIT. In addition, this expression varies according to the age of the birds, being higher in the group of 7-day-old birds versus the 26-day-old group.

Keywords: broilers, gastrointestinal tract, gene expression, taste receptors, umami.

3. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas se ha producido un aumento sustancial en el consumo de carne de ave por parte de la población, en comparación a las demás carnes. Las nuevas tecnologías de manejos genéticos implementadas en la producción de aves permiten entregar un producto de buena calidad al consumidor y maximizar la rentabilidad por kilogramo de carne producida (OIE, 2019). Así, una arista fundamental para lograr un rendimiento óptimo en aves productivas es un manejo nutricional intensivo que permita satisfacer los requerimientos específicos de los animales. Según datos de la FAO (2020), la alimentación es el insumo que representa el costo más alto para la producción avícola intensiva, por lo que la disponibilidad de alimentos de bajo precio y alta calidad es fundamental para la prosperidad de la industria.

El sistema del gusto ha evolucionado en los animales como un mecanismo para identificar alimentos nutritivos, siendo importante para la detección de carbohidratos, aminoácidos, lípidos, entre otros. Durante mucho tiempo, se pensó que las aves tenían una menor agudeza gustativa en comparación a los mamíferos, debido fundamentalmente a su bajo número de papilas gustativas. Hoy se conoce que, en broilers, de la misma manera el sentido del gusto es uno de los más importantes para adquirir y elegir alimentos, habiendo sabores como los asociados a proteínas, que son detectadas por receptores gustativos umami, las cuales podrían potenciar el consumo de alimento ya que, influyen en la percepción de una mayor palatabilidad. También, existen otras modalidades gustativas, como el amargo, que genera una reacción aversiva protegiendo a las aves contra el consumo de venenos y sustancias potencialmente tóxicas (Roura *et al.*, 2008).

La información actual indica que los receptores de compuestos de sabor umami pueden estar preservados en aves tal y como se observa en mamíferos. Así, estudios moleculares han identificado candidatos importantes para estos receptores en aves, incluyendo el receptor heterodímero T1R1/T1R3, el receptor metabotrópico de glutamato tipo 1 (mGluR1) y el tipo 4 (mGluR4). Estos últimos serían específicos en la percepción de L-glutamato, mientras que el receptor T1R1/T1R3 sería responsable de la sinergia entre L-glutamato y otros compuestos umami, lo que generaría preferencias al ser usados como suplementos en las dietas de pollos de engorda (Yoshida *et al.*, 2015).

Si bien los mecanismos asociados a la percepción de compuestos gustativos en mamíferos están bien establecidos, la información en aves respecto a este tópico aún es escasa. Por ende, es importante dilucidar estos mecanismos en pollos para mejorar la eficiencia de su nutrición a través de la entrega de alimentos más preferibles y así aumentar su rendimiento productivo. Es por esto, que el objetivo de esta Memoria de Título consistió en identificar la expresión de genes de receptores de compuestos gustativos umami en aves broiler, y comparar su variación en los diferentes segmentos del tracto digestivo y en dos etapas de la vida de estas aves.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El sentido del gusto posee un rol fundamental en la supervivencia de los animales en su vida diaria, siendo estos capaces de distinguir entre diversas modalidades gustativas, generando respuestas conductuales innatas (Zhao *et al.*, 2003). Este sentido es impulsado por códigos quimio-sensoriales que detectan el valor nutricional de las fuentes de alimentos disponibles, o su posible riesgo, y lo traducen en un estímulo fisiológico que desencadenará o desalentará su consumo (Roura *et al.*, 2008).

En aves y mamíferos los nutrientes son percibidos en la cavidad oral mediante decenas a cientos de células sensoriales que conforman las papilas gustativas. Tanto el tipo, como el número y ubicación de las papilas difiere entre las distintas especies de animales (Roura *et al.*, 2008). En mamíferos, las papilas gustativas se distribuyen en la mucosa de la zona dorsal de la lengua y la mucosa del paladar blando. Por el contrario, en pollos, estas aparecen cerca de las aberturas de las glándulas salivales y sólo el 2% se encuentra en la región posterior de la lengua. Aproximadamente el 69% de ellas están ubicadas en el epitelio del paladar y el 29% en la base de la cavidad oral (Rajapaksha *et al.*, 2018). Estas papilas se desarrollan en etapas embrionarias tardías, permaneciendo constantes hasta la edad adulta. Por otro lado, el número de papilas gustativas en pollos varía según la raza y el sexo, oscilando entre 240 a 360 según los últimos estudios publicados (Kudo *et al.*, 2008.; Niknafs y Roura, 2018). Sin embargo, Rajapaksha *et al.* (2018) demostraron mediante técnicas de biología molecular que las aves broiler tienen 507 papilas gustativas en el paladar y 260 en la base de la cavidad bucal, además de evidenciar que pollos de engorda poseen un mayor número de papilas en comparación a razas ponedoras. Cabe señalar que el número de papilas se correlaciona positivamente con la sensibilidad gustativa en este animal (Kudo *et al.*, 2010).

Los distintos sabores presentes en los alimentos estimulan las células sensoriales situadas en las papilas gustativas, traduciendo estos estímulos en señales transmitidas a las fibras nerviosas aferentes gustativas. Los sistemas de transducción de señales utilizan canales iónicos y receptores del gusto acoplados a proteínas G, como la gustducina, que juega un papel importante en la transducción de estímulos amargos, dulces y umami (Sugita, 2006.; Kudo *et al.*, 2014.; Roper y Chaudhari, 2017). De los seis sabores primarios (dulce, salado, umami, ácido, amargo y graso), las aves son capaces de distinguir cinco, excluyendo el sabor

dulce (Niknafs y Roura, 2018). En términos generales, el sabor salado ayuda en la mantención del equilibrio electrolítico en la dieta, el sabor umami en la ingesta de aminoácidos, y el sabor graso en la detección de ácidos grasos. En cambio, el sabor amargo y ácido previenen la ingesta de sustancias tóxicas o en mal estado (Zheng *et al.*, 2018).

Puntualmente, el sabor umami es aquel sabor carnosos presente en mariscos, algas, pescados, carnes y hongos. Es provocado por diversas moléculas, incluidos aminoácidos (L- glutamato, L- aspartato, entre otros), nucleótidos y péptidos. Su sabor es fuertemente potenciado por la adición de ácidos 5-ribonucleicos disódicos, en presencia de glutamato o aspartato. La detección del sabor umami puede implicar múltiples receptores expresados en las células sensoriales de las papilas gustativas, lo que podría ser la base de la percepción compleja de este sabor, con diferentes mezclas de aminoácidos, péptidos y nucleótidos que producen cualidades gustativas sutilmente diferentes. Además, se ha evidenciado que al complementar alimentos con compuestos umami se producen interacciones que pueden mejorar o disminuir la palatabilidad del alimento (Chaudhari *et al.*, 2009; Kinnamon y Vandenbeuch, 2009; Hartley *et al.*, 2019).

Los receptores del gusto para el sabor umami, junto con los receptores del sabor dulce y amargo, se pueden dividir en dos familias: los receptores del gusto tipo 1 (T1R) y los receptores del gusto tipo 2 (T2R). Existen tres subtipos de T1R: T1R1, T1R2 y T1R3. Entre ellos, el receptor T1R1 forma un dímero con T1R3 para la transducción de señales umami, y T1R2 y T1R3 para la transducción de señales dulces. Los T2R son una familia más grande de receptores proteicos responsables de detectar las señales de sabor amargo (Zheng *et al.*, 2018). Específicamente, los receptores para la detección del sabor umami en mamíferos incluyen dos receptores acoplados a proteína G selectivos de glutamato (mGluR4 y mGluR1), y, como se mencionó anteriormente, el heterodímero T1R1/T1R3. Los mGluR son activados por aminoácidos, pero no son sensibles a nucleótidos presentes en el alimento. En cambio, el dímero T1R1/T1R3 es activado por una amplia gama de aminoácidos y muestra una respuesta potenciada en presencia de nucleótidos (Chaudhari *et al.*, 2009).

Si bien en mamíferos se ha establecido la expresión de receptores del gusto y otros genes relacionados con el sabor umami en tejidos gustativos y extra gustativos, en broilers esta información es limitada. Es en este escenario que Cheled-Shoval *et al.* (2015) identificaron

por primera vez la expresión de genes relacionados con la percepción del sabor amargo y umami en el tracto gastrointestinal (TGI) de pollos, tanto en etapa embrionaria como en crecimiento (día 21). Se logró demostrar la expresión de tres receptores pertenecientes a la familia T2R y dos subtipos de receptor T1R (T1R1 y T1R3), evidenciando la falta del receptor T1R2 en estos animales. Sumado a lo anterior, se registró la presencia de T1R y T1R3 en tejidos gustativos (paladar y lengua) y extra gustativos (proventrículo, duodeno, yeyuno, ciego y colon). Simultáneamente, al comparar la expresión de los receptores del gusto en pollos de diferentes edades, se observó una expresión más alta de receptores en paladar y lengua en estados embrionarios en comparación con el día 21. Estos resultados sugieren una secuencia de eventos en el desarrollo de los mecanismos de detección del gusto en el TGI de este animal.

De forma similar, Yoshida *et al.* (2015) demostraron la expresión de los receptores mGluR1, mGluR4 y T1R1/T1R3 en tejidos orales (exceptuando la punta de la lengua) y gastrointestinales en pollos, sugiriendo la posibilidad de que el sabor umami sea percibido utilizando múltiples receptores gustativos al igual que en mamíferos, donde la activación de T1R1/T1R3 en tejidos del TGI de estos animales, estimula la secreción de colecistoquinina y provoca el reflejo peristáltico en el colon. En cuanto a los receptores mGluR, se conoce que son capaces de mejorar los mecanismos de defensa de la mucosa duodenal frente a estímulos ácidos (Akiba *et al.*, 2009). Actualmente no existen estudios que aclaren las funciones fisiológicas de los receptores umami expresados en el TGI en pollos. Sin embargo, se piensa que pueden desempeñar un papel en la regulación de la secreción de hormonas intestinales, el mantenimiento de la motilidad y la regulación de los mecanismos de defensa de la mucosa intestinal (Yoshida *et al.*, 2015). En este mismo estudio previamente mencionado, se evaluó además la ingesta de alimento mejorada sinérgicamente por potenciadores del sabor umami, mediante pruebas de preferencia. Para ello se utilizó L-glutamato monopotásico y 5'-monofosfato de inosina. Se observó que estos animales preferían el alimento con adición de ambos saborizantes umami, por sobre la adición de algunos de ellos por separado. Estos resultados sugieren que el sinergismo del sabor umami se conserva de aves a mamíferos.

En mamíferos también se describe la presencia de otros receptores que responden a proteínas hidrolizadas en el TGI. Estos incluyen el receptor sensible a calcio (CaSR), GPR92 y GPRC6A. Estos receptores responden a varios aminoácidos básicos o alifáticos (GPRC6A), aminoácidos aromáticos como L-fenilalanina, cationes divalentes (CaSR) y peptonas (GPR92) (De Jager *et al.*, 2013; Foster *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019). En pollos sólo se ha demostrado la presencia del receptor CaSR en riñones, glándula paratiroides, intestino delgado, oviducto y cerebro. No obstante, su función aún no se encuentra bien esclarecida (Deng *et al.*, 2010).

Hasta la fecha, los estudios publicados evidencian la expresión de receptores nutricionales asociados a aminoácidos en broilers, sin embargo, la distribución de las proteínas receptoras en las papilas gustativas y a lo largo del TGI no ha sido dilucidada por completo (Yoshida *et al.*, 2019). Por otro lado, la información existente sugiere que la expresión de los receptores asociados a compuestos de sabor umami podría variar durante el transcurso de la vida de este animal. En mamíferos se ha establecido que el sabor umami regula el apetito y la ingesta de alimento, mejorando su palatabilidad, lo que demuestra el gran potencial de este sabor en la alimentación de animales de abasto (Roura *et al.*, 2008). En este contexto, surge la necesidad de obtener nueva información pues la elucidación del sentido del gusto umami en pollos es un paso en la producción de nuevos alimentos, con el fin de mejorar las estrategias de alimentación actualmente utilizadas en avicultura. Es aquí donde radica la importancia de la presente Memoria de Título, la cual buscará evaluar la expresión de genes que codifican para receptores del sabor umami en pollos broiler en dos etapas distintas del ciclo productivo y en diferentes tejidos del GIT, con el fin de evidenciar posibles variaciones en el transcurso del tiempo.

5. HIPÓTESIS

Existe expresión diferencial de los genes asociados a la detección del sabor umami (T1R1, T1R3, mGluR1, mGluR4, GPR92, GPR139, GPRC6A y CaSR) en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal de pollos broiler, existiendo una mayor expresión de receptores en la etapa juvenil.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de genes codificantes para receptores asociados a la detección de sabor umami en dos etapas y en distintos tejidos del tracto gastrointestinal de pollos broiler.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la expresión de genes codificantes para receptores de sabor umami en tejidos del tracto gastrointestinal de pollos broiler.
2. Evaluar la variación de la expresión de genes codificantes para receptores de nutrientes proteicos entre pollos broiler jóvenes y adultos.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos con aves se llevaron a cabo en la Unidad Experimental de Nutrición y Producción Avícola de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET), Universidad de Chile. Esta instalación tiene una estructura convencional, con ventilación natural y un total de 32 corrales de piso, y es calefaccionada por campanas infrarrojas (a gas) con control de temperatura por termostato. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (certificado N°19320-VET-UCH). Los análisis de laboratorio se llevaron a cabo en el Laboratorio Centralizado de Investigación Veterinaria (LaCIV) de FAVET.

Los pollos broiler (Ross 308) fueron adquiridos en una empresa avícola comercial ubicada en la comuna de Pirque, Región Metropolitana. Estos fueron utilizados para evaluar un modelo de preferencias alimentarias en FAVET durante un ciclo completo de producción, donde fueron alimentados con una dieta estándar inicial los primeros 23 días de vida, que luego se cambió a dieta final (Anexo 1), ambas formuladas de acuerdo con los requerimientos nutricionales de NRC (1994) y estándares de la línea genética Ross 308. Se realizó un control semanal de consumo de alimento y se tomaron muestras de las dietas para analizar el contenido de los principales componentes en base a un análisis químico proximal. El experimento contó con un total de 128 aves, el cual se realizó en dos bandas de 64 aves por ensayo, 48 aves fueron empleadas para evaluar modelos de preferencia para otra Memoria de Título cuyos datos no son expuestos en la presente. Las remanentes 16 aves fueron utilizadas para determinar la expresión relativa de genes en el laboratorio.

Para las pruebas en laboratorio, se seleccionaron al azar 8 broilers, los días 7 y 26 para el muestreo de tejidos del TGI, aves jóvenes fue el grupo de día 7 y aves adultas las de día 26, esto tomando en consideración la longitud del ciclo productivo de estas aves de corral. Los criterios de selección se basaron en un ave por corral, que se encontrase en el peso promedio y sin evidencia externa de enfermedad o anormalidades. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical manual como método válido para la eutanasia en aves de corral (OIE, 2019).

Después de la eutanasia, se recolectaron muestras de tejido con un tamaño de 0,5 cm x 0,5 cm x 0,5 cm o el equivalente a 30 mg, de 10 secciones a lo largo del TGI de los pollos.

Esto incluye: base de paladar, base de la lengua, buche, proventrículo, molleja, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon. Se tomaron tres muestras aleatorias de cada tejido para mejorar su representación. Estas se procesaron para determinar la expresión relativa de genes asociados a la percepción del sabor umami en pollos, denominados T1R1, T1R3, mGluR1 y mGluR4 para ácido L-glutámico; CaSR y GPR139 para L-fenilalanina y L-triptófano; GPRC6A para otros L-aminoácidos y por último GPR92 para péptidos, utilizando la Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Una vez obtenidas, las muestras de tejido fueron depositadas en tubos Falcon y preservadas en hielo para su utilización inmediata en LaCIV. El procesamiento de estas muestras consistió en los siguientes pasos:

8.1 Extracción de ARN

Las muestras de los tejidos fueron traspasadas a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con B-Mercaptoetanol más buffer de lisis del kit de purificación GeneJET RNA (Thermo Scientific, UK, GB) y fueron macerados y homogenizados con un homogeneizador rotor-estator. El contenido obtenido fue enjuagado y purificado en columnas usando buffer fosfato salino (PBS) del mismo kit, y una vez finalizado el proceso, se recogió el ARN siguiendo el protocolo del fabricante.

8.2 Cuantificación de ARN (Qubit)

Las muestras de ARN obtenidas fueron preservadas en hielo y trabajadas rápidamente dado que los reactivos del kit eran fotosensibles. Las muestras fueron centrifugadas e incubadas por 2 minutos, según indicación, posteriormente se leyeron usando el equipo QUBIT 2.0 (Fluorometer, CA, EEUU), donde se evaluó la calidad y cantidad de ARN utilizando el kit de ensayo de QUBIT y ARN (Thermo Scientific, UK, GB).

8.3 Remoción de ADN Genómico

El ADN genómico se eliminó para obtener ARN purificado usando un kit de ADNasa I sin ARNasa (Thermo Scientific, UK, GB). Para el uso del Kit se determinó el volumen de muestra, reactivos y agua según cálculos realizados para 10 uL de muestra total. Los análisis

se realizaron para cada muestra por separado considerando que si la cantidad de ARN era distinta a 1000ng se debía ajustar el volumen de los reactivos proporcionalmente. Posterior al cálculo necesario para cada tubo de 0,2 ml, estos fueron incubados por 30 minutos a 37°C en Termociclador Step One (Applied Biosystems, CA, EEUU). Pasado el tiempo del primer ciclo, se agregó 10% de EDTA (1uL por cada 10 uL de muestra) y se volvió a incubar 10 minutos a 65°C para inactivar la ADNasa I en el Termociclador. Al finalizar el programa se colocaron las muestras en hielo.

8.4 Síntesis de ADNc

Las muestras y reactivos fueron centrifugados antes de ser usados. El ARN se transcribió inversamente en ADN complementario (ADNc) utilizando kit de síntesis de ADNc AffinityScript (Agilent technologies, CA, EEUU). Para llevar a cabo la síntesis, el volumen total de cada tubo fue de 20 uL. Los componentes en tubo fueron: agua libre de nucleasas, Master mix de síntesis de ADNc, Oligo (dT), RT/ARNasa AffinityScript (enzima transcriptasa reversa). Se incluyó un control sin transcriptasa reversa (RT negativo) para cada muestra para monitorear la contaminación por ADN genómico. Todos los tubos recibieron la misma cantidad de ARN en ng (40ng). Luego las muestras se incubaron en el termociclador, mediante el siguiente programa: 25°C por 5 minutos (hibridación de cebador), 42°C por 15 minutos (síntesis de ADNc); 95°C por 5 minutos (termino de transcripción reversa).

8.5 Protocolo Q-PCR en tiempo real

El ADNc se amplificó utilizando un Sistema de PCR en tiempo real Eco (Illumina, CA, EE. UU.) y una mezcla maestra del kit Brilliant SYBR Green qPCR (Agilent Technologies, CA, EE. UU.) junto con partidores oligonucleotídicos específicamente diseñados y validados que amplifican los genes objetivo y los genes de referencia de pollos broiler en este estudio. Los partidores para los genes que se estudiaron se enuncian en la Tabla 1.

Tabla 1. Partidores utilizados en el estudio

Gen de interés	Partidor <i>forward</i>	Partidor <i>reverse</i>
T1R1	CTA TGG TAG GGA TGG GCT CAA C	CTA AAG ACC AGT CCT CAG AGC C
T1R3	ACA ACT CCA CGT CAC TCC TG	CCA TAG CTG ACC TGT GGA ATC A
mGluR1	CGC GCC AGG TTA AAA GTC AC	GGT TCC TCT TGG CTG CGT AT
mGluR4	GTG CAA GCC CTG ATT GAG AAG	GTG GAG GCA TAG CTG ATC TGG
CaSR	TGG CTT CCA CCT TGT TGC TTA	GCA GCA GTG TTC CAG GTA AAC
GPR139	TGC TGA CAT CCT CGT TCT CTT	GAG TGG ATG GCA CAC AGC TA
GPRC6A	GGA GGT TTG TTT GCA GTT CAC A	TTT GGA CAG GAA CCT CAG AGC
GPR92	GGA CAA ACC TGG CAC TCA GA	GCT AGG GGC TTT CTG TGG TT
ACTIN (gen de referencia)	GAG AAA TTG TGC GTG ACA TCA	CCT GAA CCT CTC ATT GCC A
GAPDH (gen de referencia)	GTA GTG AAG GCT GCT GCT GA	TCC TTG GAT GCC ATG TGG AC

Para realizar el PCR, se utilizaron tubos Ependorf 500 uL, en ellos se agregó la solución madre de cada gen, la cual incluyó: agua libre de nucleasas, mezcla maestra, partidor *forward* y partidor *reverse*, esto tanto para las soluciones con genes de referencia como para los genes objetivos. Las soluciones preparadas, se centrifugaron y cargaron en la placa de PCR para terminar con el protocolo de amplificación y análisis correspondiente.

8.6 Obtención de datos y análisis estadístico

Para la cuantificación de los resultados obtenidos se utilizó el software estadístico RStudio (versión 4.1.3). El test de Shapiro–Wilk fue empleado para evaluar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para evaluar la homocedasticidad. El resultado de estas pruebas arrojó que los datos no siguieron una distribución normal y además eran heterocedásticos, por lo que se procedió a transformar los datos utilizando bases en logaritmo, lambda y otros (Anexo 2). Una vez transformados y para determinar el efecto de las variables edad, tejido e

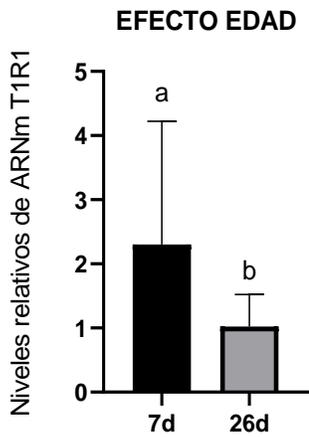
interacción se llevó a cabo la prueba paramétrica de ANDEVA y para determinar las diferencias entre las medias se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey, el nivel α para la determinación de significancia fue 0,05.

9. RESULTADOS

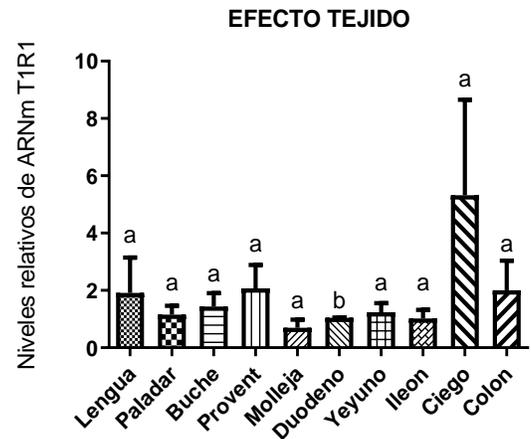
9.1 Abundancia relativa de ARNm de T1R1

Al analizar el efecto edad en el gen T1R1 (FIGURA 1.A) se determinó una expresión significativamente mayor del grupo de 7 días en comparación con el grupo de día 26 ($p < 0,0001$). Al analizar el efecto tejido, se observó la expresión de este gen en todos los tejidos analizados, detectándose una expresión menor en el duodeno en comparación con los demás tejidos ($p < 0,0001$; FIGURA 1.B). La interacción edad*tejido no fue significativa ($p > 0,357$; FIGURA 1.C / FIGURA 1.D).

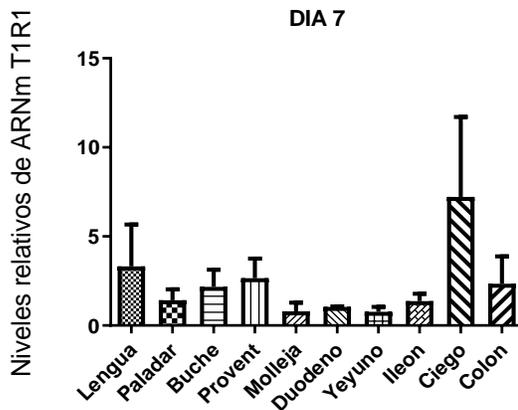
1.A



1.B



1.C



1.D

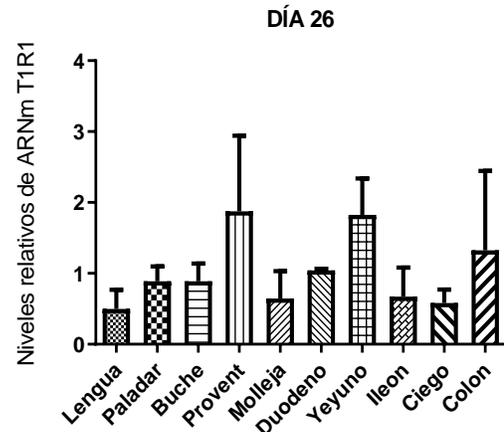


Figura 1. Análisis qPCR de la abundancia relativa de ARNm de T1R1 según efecto edad, tejido e interacción.

9.2 Abundancia relativa de ARNm de T1R3

Al analizar el efecto edad del gen T1R3 (FIGURA 2.A) se determinó una expresión significativamente mayor del grupo de 7 días en comparación con el grupo de día 26 ($p < 0,0001$). Al analizar el efecto tejido, se determinó la expresión de este gen en todos los tejidos analizados, detectándose una expresión menor en el yeyuno en comparación con paladar, buche, molleja, íleon y ciego ($p < 0,0001$; FIGURA 2.B). Al analizar la interacción edad*tejido se observó que esta fue significativa ($p < 0,05$), a los 7 días se presentó una expresión menor en yeyuno en comparación con la lengua, buche, ciego y colon (FIGURA 2.C), pero a los 26 días la expresión fue menor en el ciego en comparación con el yeyuno (FIGURA 2.D).

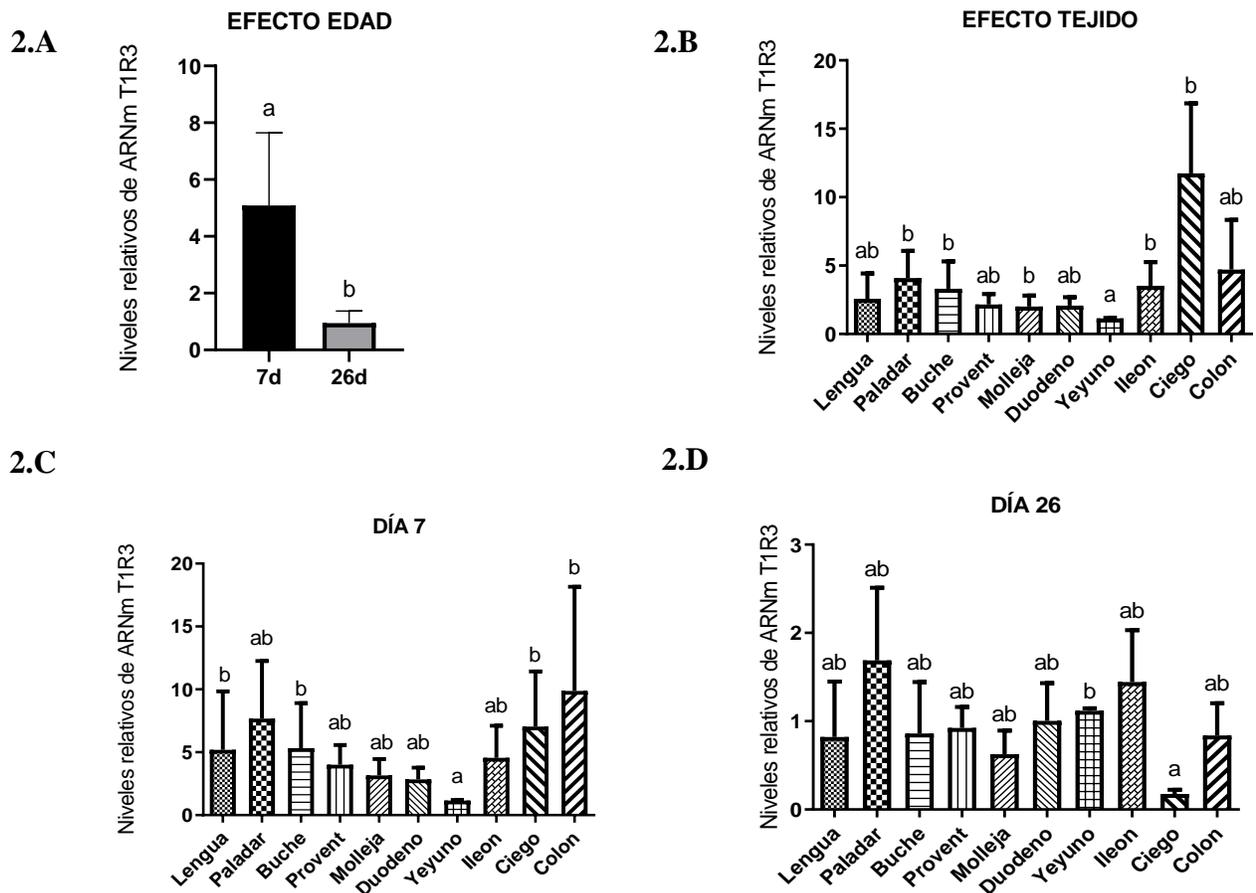


Figura 2. Análisis qPCR de la abundancia relativa de ARNm de T1R3 según efecto edad, tejido e interacción.

9.3 Abundancia relativa de ARNm de mGLuR1

Al analizar el efecto edad del gen MGLUR1 (FIGURA 3.A) no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,37$) entre individuos jóvenes y adultos. Al analizar el efecto tejido, se evidencio una ausencia de expresión génica en la lengua, el resto de los tejidos tuvieron expresión, aunque no se encontró significancia ($p > 0,06$; FIGURA 3.B). Al evaluar la interacción edad*tejido, se observó que esta fue significativa ($p < 0,05$), ausentándose la expresión en la lengua tanto a los 7 días (FIGURA 3.C) como a los 26 días; a esta edad además se evidencio una expresión menor en el íleon en comparación con el paladar (FIGURA 3.D).

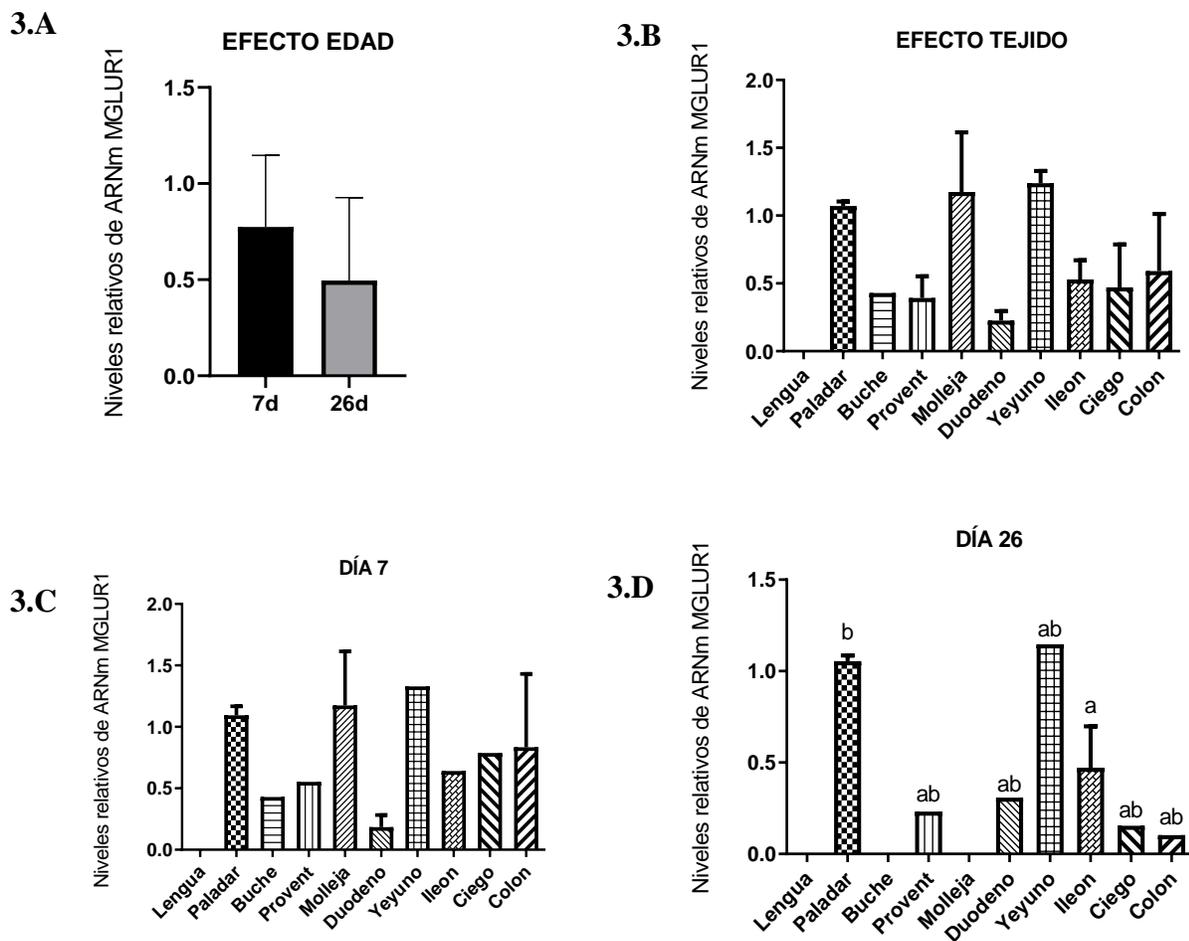


Figura 3. Análisis qPCR de la abundancia relativa de ARNm de MGLUR1 según efecto edad, tejido e interacción.

9.4 Abundancia relativa de ARNm de mGLuR4

Al analizar el efecto edad del gen MGLUR4 (FIGURA 4.A) no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,24$), entre individuos jóvenes y adultos. Al analizar el efecto tejido (FIGURA 4.B), se determinó expresión génica solo en los tejidos lengua y paladar, donde la expresión en lengua fue mayor que paladar ($p < 0,0001$). Al evaluar la interacción edad*tejido se determinó una expresión significativamente mayor ($p < 0,001$) de la lengua en comparación con el paladar en el grupo de 7 días (FIGURA 4.C; FIGURA 4.D).

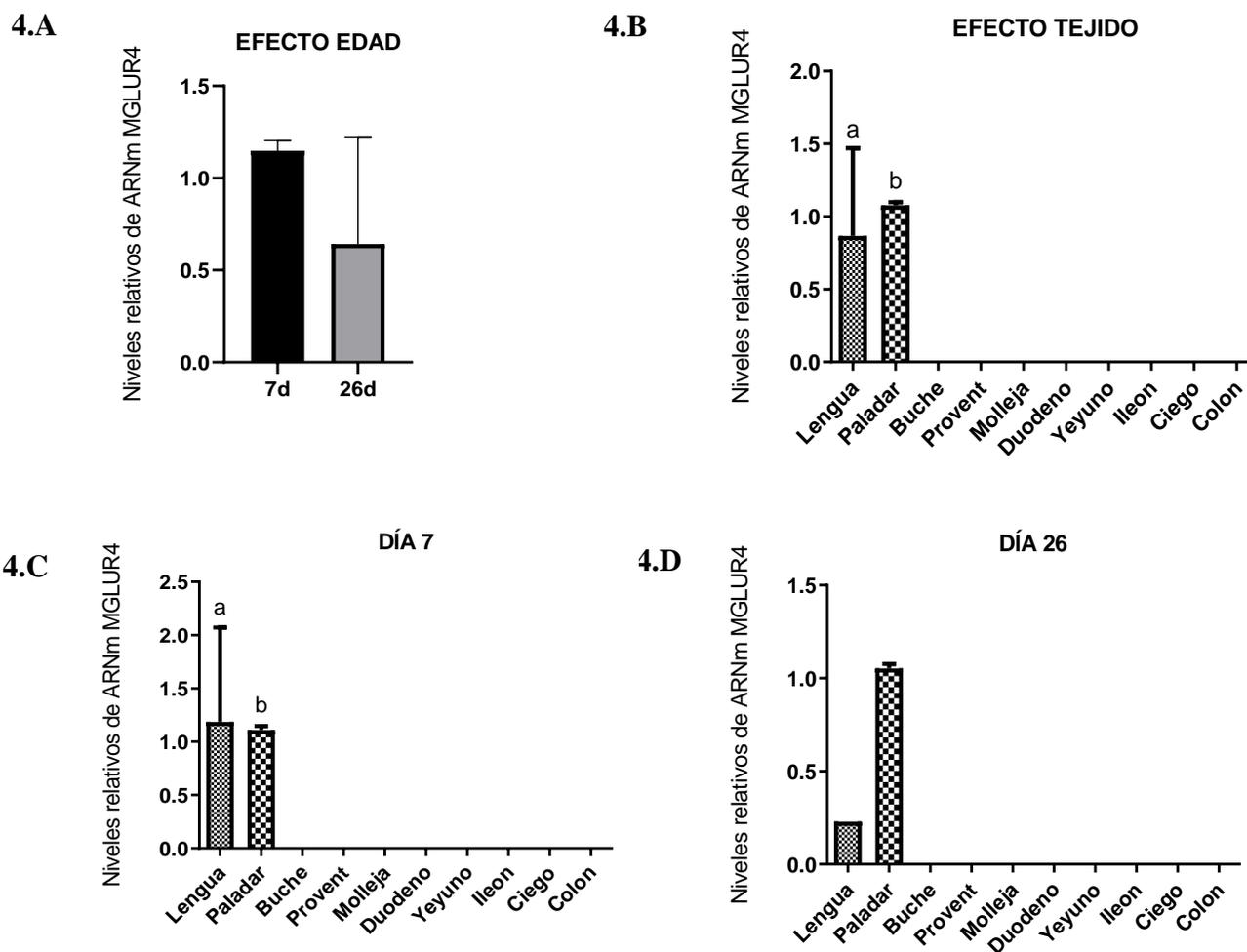
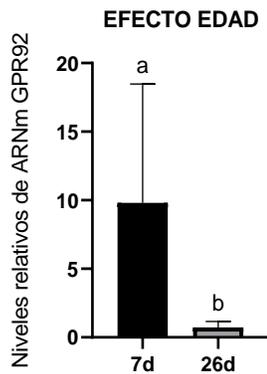


Figura 4. Análisis qPCR de la abundancia relativa de ARNm de MGLUR4 según efecto edad, tejido e interacción.

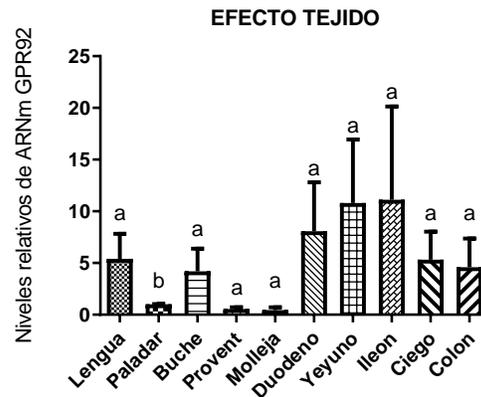
9.5 Abundancia relativa de ARNm de GPR92

Al analizar el efecto edad del gen GPR92 (FIGURA 5.A) se determinó una expresión significativamente mayor del grupo de 7 días en comparación con el grupo de día 26 ($p < 0,0001$). Al analizar el efecto tejido, se determinó la expresión de este gen en todos los tejidos analizados, detectándose una menor expresión en el paladar en comparación con los demás tejidos ($p < 0,0001$; FIGURA 5.B). Al analizar la interacción edad*tejido se observó que esta fue significativa ($p < 0,05$), a los 7 días se presentó una menor expresión en la molleja en comparación con yeyuno e íleon (FIGURA 5.C), a los 26 días la expresión de la molleja fue menor en comparación con lengua, paladar, buche y yeyuno; Además, hubo una mayor expresión en el paladar en comparación con proventrículo, molleja, íleon y ciego (FIGURA 5.D).

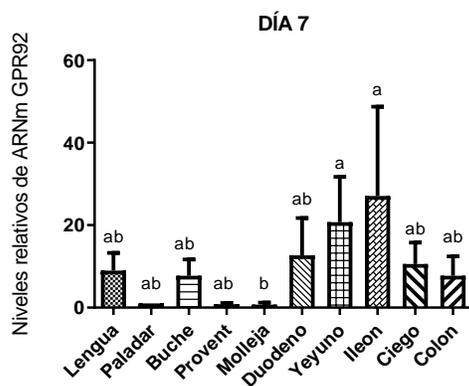
5.A



5.B



5.C



5.D

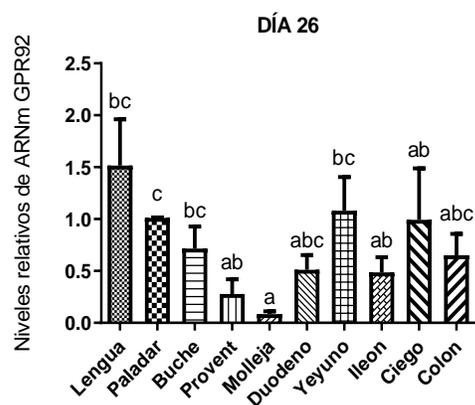


Figura 5. Análisis qPCR de la abundancia relativa de ARNm de GPR92 según efecto edad, tejido e interacción.

9.6 Abundancia relativa de ARNm de CASR

Al analizar el efecto edad del gen CASR (FIGURA 6.A) se determinó una expresión significativamente mayor del grupo de 7 días en comparación con el grupo de día 26 ($p < 0,05$). Al analizar el efecto tejido, se evidencio una ausencia de expresión génica en la molleja, el resto de los tejidos tuvieron expresión, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,11$; FIGURA 6.B). La interacción edad*tejido fue significativa ($p < 0,001$). La expresión en la molleja estuvo ausente a los 7 días, y se presentó una mayor expresión en el proventrículo en comparación con el duodeno (FIGURA 6.C). En cambio, a los 26 días se ausento la expresión génica en lengua, paladar, buche, molleja y ciego, sin diferencias significativas entre ellos (FIGURA 6.D).

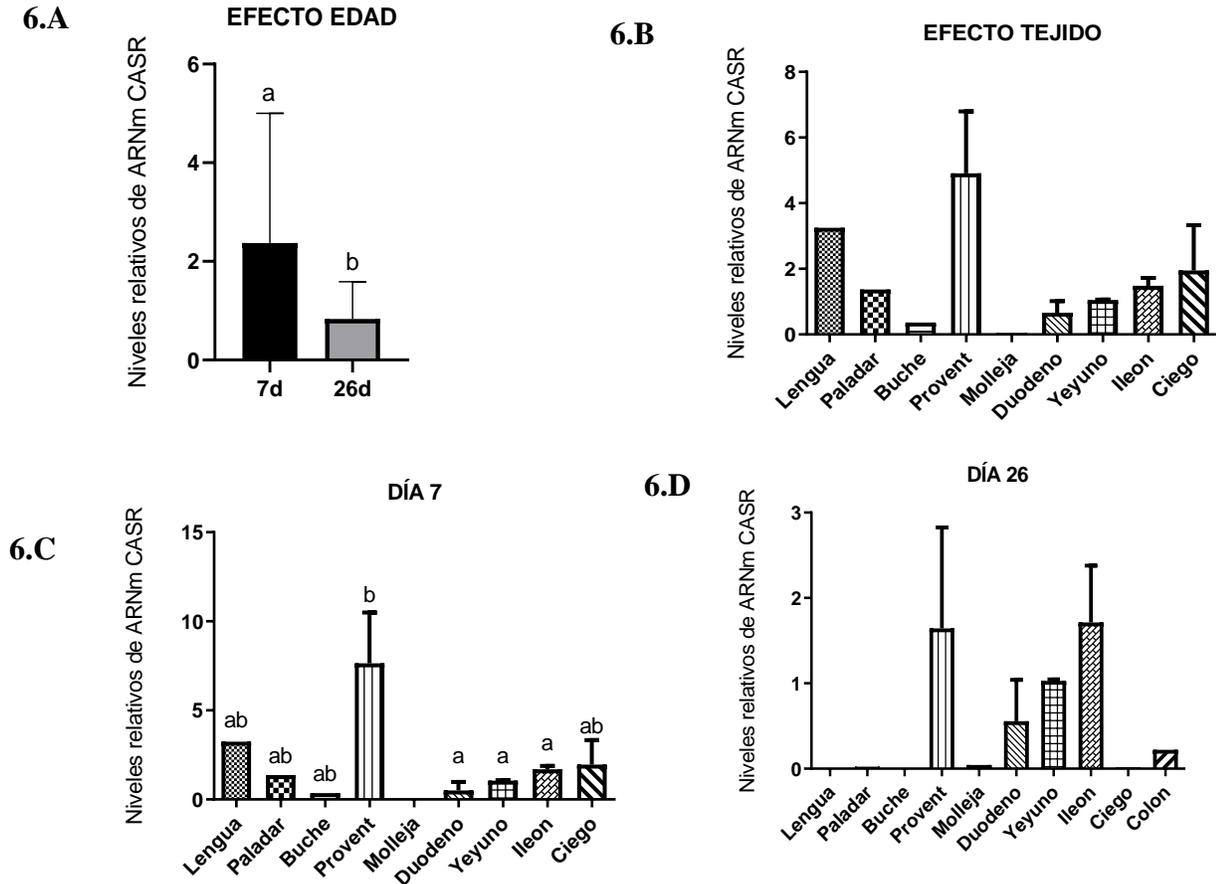


Figura 6. Análisis qPCR de la abundancia relativa de ARNm de CASR según efecto edad, tejido e interacción.

9.7 Abundancia relativa de ARNm de GPR139

Las cantidades de mRNA detectadas de este gen fueron muy bajas por lo que no fue posible realizar pruebas estadísticas ni evaluar el efecto edad ni el efecto tejido. Sin embargo, en la interacción de los tejidos con las diferentes edades se observó una ligera reacción del gen en duodeno, colon y ciego para el grupo de 7 días, en el grupo de 26 días reacciono en duodeno, yeyuno y ciego en el grupo de animales de 26 días.

9.8 Abundancia relativa de ARNm de GPRC6A

Las cantidades detectadas de mRNA de este gen fueron muy bajas por lo que no fue posible realizar pruebas estadísticas ni evaluar el efecto edad ni el efecto tejido, sin embargo, en la interacción de los tejidos con las diferentes edades se observó una reacción del gen en el colon y ciego para los grupos de 7 y 26 días.

10. DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró demostrar la presencia de receptores asociados a la percepción de compuestos de sabor umami, evidenciando genes codificantes de la familia de receptores T1R (T1R1 y T1R3), receptores acoplados a proteína G como GPR92, GPR139, GPRC6A y otros receptores como CaSR. Algunos de ellos fueron encontrados a lo largo de todo el TGI de los pollos, desde la cavidad oral hasta la última porción del intestino grueso en los animales estudiados. Por otro lado, se evaluó la variación de la expresión de genes codificantes para estos receptores de nutrientes proteicos entre aves jóvenes y adultas, reflejando variaciones significativas en algunos casos.

Respecto al heterodímero T1R1/T1R3, se encontró la expresión de ARNm de genes asociados a este receptor en todos los tejidos evaluados en este estudio, tanto en aves jóvenes como adultas, lo que se condice con resultados obtenidos en estudios previos realizados por Cheled-Shoval *et al.* (2015), Yoshida *et al.* (2015), Niknafs y Roura (2018) y Dong (2020). Puntualmente, Cheled-Shoval *et al.* (2015) evidenciaron además que la expresión de genes asociados a T1R1/T1R3 en el colon fue significativamente mayor que en duodeno en pollos de 21 días de edad. Sin embargo, Dong (2020) no encontró diferencias significativas en la presencia de T1R1/T1R3 entre ambos tejidos en aves de 35 días. De igual forma, en ambos estudios se demostró que la presencia de T1R1/T1R3 es mayor en tejidos del TGI posterior (duodeno, yeyuno, íleon y colon) que en los demás órganos evaluados. Este mismo resultado fue obtenido en nuestros ensayos, donde se determinó una mayor expresión de T1R1/T1R3 en ciego y colon en comparación a otros tejidos. Dong (2020) atribuyó las diferencias obtenidas con Cheled-Shoval *et al.* (2015) a la utilización de aves de diferentes edades y razas, no obstante, estos resultados podrían estar asociados a funciones de motilidad intestinal como se ha descrito previamente en mamíferos (Kendig *et al.*, 2014). Esto sugiere que los receptores T1R1/T1R3 podrían desempeñar un papel importante en la detección de aminoácidos y otras señales químicas a lo largo del intestino del pollo con participación en la regulación de la secreción de hormonas intestinales, el mantenimiento de la motilidad intestinal y la regulación de mecanismos de defensa de la mucosa, al igual que en mamíferos, donde los nutrientes detectados por los receptores de sabor (TR), inducen la secreción de neuropeptidos y transportan señales químicas al cerebro, lo que regula la utilización de

nutrientes, la movilidad intestinal, el apetito y el metabolismo. Se conoce también que estimulan la secreción de colecistoquinina y su activación en colon provoca el reflejo peristáltico, sumado a la propulsión del sedimento (Crowe *et al.*, 2020; Depoortere, 2014; Daly *et al.*, 2013 y Kendig *et al.*, 2014).

En cuanto a la variación de la expresión génica de T1R1/T1R3 en aves jóvenes y adultas, se determinó una expresión significativamente mayor en pollos jóvenes (día 7), en comparación a pollos adultos (día 26). Resultados similares fueron obtenidos por Dong (2020), quién evidenció una expresión alta de T1R1 en la primera semana post nacimiento, la que disminuyó paulatinamente hasta alcanzar una expresión significativamente menor a los 21 días. En esta misma investigación, la expresión de T1R3 no varió significativamente, pero se observó un aumento en yeyuno durante la etapa tardía. Estos hallazgos podrían deberse a un desarrollo normal del animal después de eclosionar o podría ser por un efecto de tipo exógeno ejercido por el tipo de dieta ofrecido durante la primera etapa del ciclo productivo de las aves, cuya composición nutricional se basa en un mayor porcentaje de proteína con la finalidad de cubrir los requerimientos de estos animales en etapas más tempranas. Se podría entonces especular que una mayor presencia de compuestos de sabor umami como aminoácidos entregados en la dieta podría generar un feed-back positivo sobre la expresión de receptores que detectan estos compuestos de origen proteico y aminoacídico.

Los receptores metabotrópicos del glutamato mGluR1 y mGluR4 tuvieron expresiones distintas a lo largo del TGI de estos animales. Específicamente, mGluR1 no se expresó en la lengua y su presencia en buche y molleja tuvo una variación significativa entre aves jóvenes y adultas, disminuyendo considerablemente en estas últimas. En cuanto a mGluR4, esta se evidenció sólo en los tejidos de la lengua y paladar en ambos grupos. Yoshida *et al.* (2015), demostraron por primera vez la existencia de estos receptores en tejidos orales y extra – orales (excepto la punta de la lengua) en aves jóvenes sometidas a pruebas de selección de alimentos. En roedores, se encuentra descrito que ambos receptores expresados en duodeno modulan la defensa de la mucosa duodenal frente a los estímulos ácidos (Akiba *et al.*, 2009). Más tarde, Choudhuri *et al.* (2016) demostraron que la expresión de mGluR1 y mGluR4 jugaba un rol en la regulación de la secreción duodenal durante la digestión. Si bien se logró evidenciar la presencia de estos receptores en diferentes zonas del TGI en estos animales, no

existen hasta la fecha estudios que ayuden a comparar los resultados obtenidos en esta investigación ni revelar las funciones de estos receptores en pollos. En base a las pocas investigaciones publicadas sobre estos receptores, se puede suponer que las aves poseen receptores gustativos para compuestos umami en sus tejidos orales y extra – orales, sin embargo, no existen investigaciones que abalen esta hipótesis ni tampoco se conoce si las células sensoriales de las papilas gustativas que expresan estos receptores son capaces de enviar impulsos nerviosos con la finalidad de transducir señales gustativas (Yoshida *et al.*, 2018).

El gen GPR92 se encontró expresado en todos los tejidos evaluados, presentando un efecto edad significativo, evidenciando una alta expresión en aves jóvenes (7 días) en comparación con aves adultas (26 días). Sobre las variaciones de expresión de este receptor en los diferentes tejidos de ambos grupos etarios, en pollos jóvenes la expresión fue mayor en yeyuno e íleon por sobre la molleja. En cambio, en el grupo de aves adultas la expresión más alta la obtuvieron la lengua y el yeyuno. Al juntar ambos grupos de estudio, los tejidos con mayor presencia de GPR92 fueron duodeno, yeyuno, íleon por sobre el paladar. Es importante señalar que existen pocos estudios a la fecha sobre este gen, por lo que no se comprende a cabalidad su expresión ni funcionalidad en aves. Sin embargo, Rettenberg *et al.* (2015) demostraron en roedores que este receptor se encuentra ligado a la actividad digestiva, incluyendo la secreción de hormonas reguladoras como la gastrina. Estos autores respaldan la idea que este receptor es particularmente relevante para la detección de alimentos proteicos parcialmente digeridos, pues evidenciaron que una dieta rica en proteínas indujo niveles significativamente más altos de GPR92, aumentando su expresión en la mucosa gástrica y algunas papilas gustativas de estos animales, concluyendo además que la variación de la expresión de este receptor inducida por proteínas puede afectar la percepción orosensorial de las proteínas de la dieta. En base a los resultados obtenidos en nuestro estudio y considerando la diferencia de expresión génica en el grupo de jóvenes contra el grupo de los viejos se refuerza la idea de que una alta presencia de compuestos sabor umami en la dieta podría aumentar la expresión de receptores que detectan compuestos de origen proteico y aminoacídico, pues existió una diferencia significativa entre aves jóvenes y adultas, considerando que las primeras presentan una mayor cantidad de proteína en su dieta.

El receptor sensible a calcio CaSR tuvo una expresión variable a lo largo del TGI, no estando presente en molleja, pero evidenciando una mayor expresión en el tracto digestivo anterior (paladar, base de lengua, buche, proventrículo, molleja), en comparación al tracto posterior (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon), pues se encontró una diferencia significativa en proventrículo en contraste con duodeno, yeyuno e íleon. En el año 2010, Deng y colaboradores encontraron expresión de este receptor en riñones, glándula paratiroides, intestino delgado, oviducto y cerebro de pollos. Posteriormente, Hui *et al.* (2021) demostraron la distribución molecular y localización de este receptor, encontrándose en riñones, proventrículo, duodeno, yeyuno, íleon, colon, ciego, hueso y oviducto de aves ponedoras, manifestando una mayor expresión en riñón, proventrículo e intestino delgado. Sumado a lo anterior, establecieron que una de las funciones de CaSR en estos animales sería detectar los cambios en la concentración de calcio a nivel intestinal. Estos resultados coinciden con los encontrados en el presente estudio, donde se encontró una mayor expresión en proventrículo e intestino delgado, lo que podría indicar la activa función de los receptores de calcio CaSR en la secreción de hormonas involucradas en la digestión de proteínas y absorción de aminoácidos. Simultáneamente, los mismos investigadores nombrados previamente, evaluaron la expresión de CaSR en diferentes etapas productivas de las aves de postura, no evidenciando cambios significativos, lo que se contrapone a lo obtenido en esta Memoria en la cual se observó una mayor expresión de este receptor en el grupo de 7 días. Estas diferencias podrían atribuirse a las distintas metodologías utilizadas en ambas investigaciones, pues Hui *et al.* (2021) tomaron muestras de gallinas ponedoras en tres etapas de postura (19, 40 y 55 semanas), es decir, no sólo varió la raza de los animales, sino que también la edad de muestreo y por ende su alimentación, ya que poseen fines productivos distintos y su plan nutricional cambia según su finalidad.

Finalmente, respecto de GPR139 y GPRC6A, su expresión baja y nulo efecto edad se explicaría porque si bien, responden a señales químico-sensoriales, son considerados genes extra gustativos presentes en el cerebro glándula paratiroides y riñones (Dao, 2021), órganos que no fueron evaluados en la presente memoria de título. En el estudio realizado en roedores por Rettenberg *et al.* (2015), también se evaluó la presencia del receptor GPRC6A, encontrándose esta en una cantidad significativamente menor que el receptor GPR92, lo que también se evidenció en nuestros resultados. En la actualidad, su función aún no está clara,

pero se cree que puede controlar los niveles de aminoácidos en el contenido luminal, detectando los niveles de proteína.

Basándonos en los resultados obtenidos tanto en este estudio como en las escasas investigaciones que existen actualmente sobre los genes asociados a receptores de compuestos umami en pollos, es evidente la necesidad de obtener más información. Se requieren estudios que demuestren las funciones de los receptores expresados en todo el TGI de estas aves, pues los estudios publicados establecen la morfología, distribución y desarrollo de las papilas gustativas, sumado a la evidencia de la expresión de receptores para compuestos umami en tejidos gustativos y extragustativos. Sin embargo, sus funciones no han sido dilucidadas por completo. Un estudio más en profundidad sobre las funciones fisiológicas de los receptores gustativos umami expresados en el TGI de pollos serían de gran utilidad para comprender de mejor manera la salud intestinal, dada su importancia directa sobre la eficiencia en la avicultura (Yoshida *et al.*, 2015), así como el efecto de la dieta y la identificación de compuestos umami que impulsan el apetito específico de proteínas que podría ayudar a mejorar el consumo y la eficiencia de utilización de alimento en las dietas de aves de corral (Roura *et al.*, 2013). Un abordaje holístico del sistema del gusto aviar, con todas sus implicancias proporcionaría herramientas sólidas para mejorar la nutrición aviar. Además, poco se conoce sobre los polimorfismos genéticos en los receptores del gusto en pollos y los efectos que podrían generar en la regulación del consumo de alimento, justificando esto una mayor investigación.

Futuras investigaciones deberían centrarse en el estudio detallado de los receptores gustativos en aves, ya que, se ha visto que en otros animales estos receptores presentes en la cavidad oral y TGI influyen en las respuestas conductuales y fisiológicas. Puntualmente, Hartley *et al.* (2019) informaron que los receptores del gusto aumentan el apetito y el crecimiento en animales. Por estas razones, comprender el papel de los receptores del gusto en pollos es una forma potencial de mejorar el rendimiento del crecimiento y la salud intestinal como se mencionó previamente. También sería relevante evaluar si se obtuviesen resultados similares al evaluar pollos de mayor edad o analizar grupos de aves con diferentes dietas.

11. CONCLUSIONES

De la presente Memoria de Título, se puede concluir que existe expresión diferencial de receptores asociados a la percepción de compuestos de sabor umami en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal de las aves broiler, y, además, esta expresión varía según la edad de las aves, siendo mayor en el grupo de aves de 7 días contra el grupo de 26 días. Por lo tanto, se valida la hipótesis planteada en el trabajo.

Son necesarios más estudios que profundicen sobre la percepción de sabores en las aves, estos nuevos hallazgos sirven como base para nuevos ensayos y para dilucidar nuevas aplicaciones de esta materia en la nutrición avícola.

12. BIBLIOGRAFÍA

AKIBA, Y., WATANABE, C., MIZUMORI, M., KAUNITZ, JD. 2009. Luminal L-glutamate enhances duodenal mucosal defense mechanisms via multiple glutamate receptors in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297(4): 81-91.

CHAUDHARI, N., PEREIRA, E., ROPER, S. 2009. Taste receptors for umami: the case for multiple receptors. *Am. J. Clin. Nutr.* 90(3): 738-742.

CHELED-SHOVAL S.L., DRUYAN S., Z. UNI. 2015. Bitter, sweet and umami taste receptors and downstream signaling effectors: expression in embryonic and growing chicken gastrointestinal tract. *Poult. Sci. J.* 94(8): 1928-1941.

CHOUDHURI, S. P., DELAY, R. J., & DELAY, E. R. 2016. Metabotropic glutamate receptors are involved in the detection of IMP and L-amino acids by mouse taste sensory cells. *Neuroscience*, 316, 94-108.

CROWE, M., WANG, H., BLAKENEY, B., MAHAVADI, S., SINGH, K., GRIDER, J. 2020. Expression and Function of Umami Receptors T1R1/T1R3 in Gastric Smooth Muscle. *J. Neurogastroenterol. Motil* 32(2).

DALY, K., AL-RAMMAHI, M., MORAN, A., MARCELLO, M., NINOMIYA, Y., & SHIRAZI-BEECHEY, S. P. 2013. Sensing of amino acids by the gut-expressed taste receptor T1R1-T1R3 stimulates CCK secretion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304(3). G271–G282.

DE JAGER, N., ZHAN, M., RZEPUS, M., ROURA, E. 2013. Towards defining the taste receptor repertoire in the pig. **In:** Proceedings of the Australasian Pig Science Association: Manipulating Pig Production XIV. Melbourne, Australia. 24-27 noviembre 2013. Australasian Pig Science Association pp. 147.

DENG, G., BI, J., QIAO, J., HE, G., WU, B., ZHANG, M., LV, N. 2010. Expression and tissue distribution of extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) mRNA in chickens. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 34(3): 249-254.

DEPOORTERE, I. 2014. Taste Receptors of the Gut: Emerging Roles in Health and Disease. *Gut* 63(1): 90-179.

DONG, B. 2020. Molecular characterization and expression of umami receptors T1R1/T1R3 in broiler chickens. Master of Science. Winnipeg, Canada. Department of Animal Science, University of Manitoba. 99 p.

FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. 2020. Producción y productos avícolas. [en línea]. <<http://www.fao.org/poultry-production-products/production/nutrition-feeding/es/>> [consulta: 29-09-2020].

FOSTER, SR., PORRELLO, ER., PURDUE, B., CHAN, HW., VOIGT, A, FRENZEL S, HANNAN RD, MORITZ KM, SIMMONS DG, MOLENAAR P, ROURA, E., BOEHM, U., MEYERHOF, W., THOMAS, WG. 2013. Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLoS One*. 8(5), e64579.

HARTLEY, I., LIEM, D., KEAST, R. 2019. umami as an ‘alimentary’ taste. A new perspective on taste classification nutrients, 11(1): 182.

HUI, Q., ZHAO, X., LU, P., LIU, S., NYACHOTI, M., KARMIN, O., YANG, C. 2021. Molecular distribution and localization of extracellular calcium-sensing Receptor (CASR) and Vitamin D Receptor (VDR) at three different laying stages in laying hens (*Gallus Gallus Domesticus*). *Genet. Mol. Biol.* 100(5): 101060.

KENDIG, D. M., HURST, N. R., BRADLEY, Z. L., MAHAVADI, S., KUEMMERLE, J. F., LYALL. 2014. Activation of the umami taste receptor (T1R1/T1R3) initiates the peristaltic reflex and pellet propulsion in the distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 307(11), G1100–G1107.

KINNAMON, S., VANDENBEUCH, A. 2009. Receptors and transduction of umami taste stimuli. *Ann. New York Acad. Sci.* 1170(1): 55–59.

KUDO, K., NISHIMURA, S., TABATA, S. 2008. Distribution of taste buds in layer-type chickens: Scanning electron microscopic observations. *J. Anim. Sci.* 79(6): 680-685.

KUDO, K., SHIRAISHI, J., NISHIMURA, S., BUNGO, T., TABATA, S. 2010. The number of taste buds is related to bitter taste sensitivity in layer and broiler chickens. *Anim. Sci J.* 81(2): 240-4.

KUDO, K., KAWABATA, F., NOMURA, T., ARIDOME, A., NISHIMURA, S., TABATA, S. 2014. Isolation of chicken taste buds for real-time Ca_2^+ imaging. *J. Anim. Sci.* 85(10):904-909.

NIKNAFS, S.; ROURA, E. 2018. Nutrient sensing, taste and feed intake in avian species. *Nutr. Res. Rev.* 31(2):256-266.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. 2019. Killing of animals for disease control purposes. In: *Terrestrial Animal Health Code.* 28th Ed. OIE. pp. 1-22.

RAJAPAKSHA, P., WANG, Z., VENKATESAN, N., TEHRANI, K., PAYNE, J., SWETENBURG, R., KAWABATA, F., TABATA, S., MORTENSEN, L., STICE, L., BECKSTEAD, R., LIU, H. 2018. Labeling and analysis of chicken taste buds using molecular markers in oral epithelial sheets. *Sci. Rep.* 6(12p).

RETTENBERGER, A., SCHULZE, W., BREER, H., HAID, D. 2015. Analysis of the protein related receptor GPR92 in G-cells. *Front. Physiol.* 6: 26.

ROPER, S., CHAUDHARI, N. 2017. Taste buds: cells, signals and synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 18(8): 485-497.

ROURA E.; HUMPHREY B.; TEDÓ G.; IPHARRAGUERRE I. 2008. Unfolding the codes of short-term feed appetite in farm and companion animals. A comparative oronasal nutrient sensing biology review. *Can. J. Anim. Sci.* 88(4): 535-558.

SUGITA, M. 2006. Taste perception and coding in the periphery. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 2000-2015.

WANG, H., MURTHY, K., GRIDER, J. 2019. Expression patterns of L-amino acid receptors in the murine STC-1 enteroendocrine cell line. *Cell Tissue Res.* 378(3): 471-483.

YOSHIDA Y.; KAWABATA Y.; KAWABATA F.; NISHIMURA S.; TABATA S. 2015. Expression of multiple umami taste receptors in oral and gastrointestinal tissues, and umami taste synergism in chickens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 466(3): 346-349.

YOSHIDA Y.; KAWABATA Y.; KAWABATA F.; NISHIMURA S.; TABATA S. 2018. Short-term perception of and conditioned taste aversion to umami taste, and oral expression patterns of umami taste receptors in chickens. *Physiol. Behav.* 191: 29-36.

YOSHIDA, Y., WANG, Z., TEHRANI, K. F., PENDLETON, E. G., TANAKA, R., MORTENSEN, L. J., NISHIMURA, S., TABATA, S., LIU, H. X., & KAWABATA, F. 2019. Bitter taste receptor T2R7 and umami taste receptor subunit T1R1 are expressed highly in Vimentin negative taste bud cells in chickens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 511(2): 280-286.

ZHAO, G., ZHANG, Y., HOON, M., CHANDRASHEKAR, J., ERLLENBACH, I., RYBA, N., ZUKER, C. 2003. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell.* 115(3): 255-266.

ZHENG, X., XU, X., HE, J., ZHANG, P., CHEN, J., ZHOU, X. 2018. Development and homeostasis of taste buds in mammals. *West China Journal of Stomatology*, 36(5), 552-558.

13. ANEXOS

Anexo 1: Dietas estándar iniciales y finales

Dieta broiler inicial:

Ingrediente	Porcentaje de inclusión
Maíz grano	55,4%
Afrecho de soya 47	27%
Afrechillo de trigo	5%
Afrecho Raps	4%
Gluten meal 60	3%
Aceite de oleína	1,65%
Conchuela gruesa	1,40%
Fosfato dicálcico	1,18%
Coccidiostato	0,5%
Micofix plus ₁	0,5%
Sal común	0,44%
Lisina	0,22%
Metionina	0,21%
Mix vitamínico – mineral – fitasa ₂	0,20%
Formicit dry ₃	0,10%

Dieta broiler final:

Ingrediente	Porcentaje de inclusión
Maíz grano	63%
Afrecho de soya 47	19,2%
Afrecho Raps	7%
Afrechillo de trigo	5%
Aceite de oleína	2%
Conchuela gruesa	1,60%
Fosfato dicálcico	0,71%
Coccidiostato	0,5%
Micofix plus ₁	0,5%
Sal común	0,40%
Metionina	0,31%
Mix vitamínico – mineral – fitasa ₂	0,20%
Lisina	0,16%
Formicit dry ₃	0,10%

¹Micofix plus: Aditivos, Solución Integral para Micotoxinas (Virbac).

²(Nucleo Plin 307) Contiene por kilo de premezcla: 4.000.000 UI de Vit. A; 1.250.000 UI de Vit. D3; 7.500 UI de Vit. E; 750 mg de K3; 750 mg de Vit. B1; 2,5 g de Vit. B2; 17,5 g de Niacina; 6,6 g de Pantotenato de Calcio; 1250 mg de Vit. B6; 6 mg de Vit. B12; 500 mg de

Ac. Fólico; 50 mg de Biotina; 199,8 g de Colina; 12,5 g Hierro; 35 g de Manganeso; 30 g de Zinc; 3 g de Cobre; 75 mg de Selenio; 50 g de Antox; 250 mg de Yodo; 50 g de Hostazym X; 25 g de Optiphos G.

³Formicid Dry: Aditivo Nutricional, Preservante anti-salmonella sp, para conservación de alimentos (Veterquímica SA).

Anexo 2: Formulas de transformación de datos para el software RStudio

FACTORES			
GEN	EDAD	TEJIDO	INTERACCION
T1R1	<pre>bc3 <- MASS::boxcox(base\$gen~base\$edad1) (lambda3 <- bc3\$x[which.max(bc3\$y)]) base\$gen15 <- ((base\$gen^lambda3)- 1)/lambda3 (lambda=0.1818182)</pre>	<pre>base\$gen4<- (1)/(abs(log(base\$gen)))^(-1/8)</pre>	<pre>base\$gen1<- 1/((base\$gen+1)^2) bc2 <- MASS::boxcox(gen~organano, data=filter(base, edad==26)) (lambda2 <- bc2\$x[which.max(bc2\$y)]) base\$gen14 <- ((base\$gen^lambda2)- 1)/lambda2 (lambda=0.3030303)</pre>
T1R3	<pre>bc3 <- MASS::boxcox(base\$gen~base\$edad1) (lambda3 <- bc3\$x[which.max(bc3\$y)]) base\$gen15 <- ((base\$gen^lambda3)- 1)/lambda3 (lambda=- 0.02020202)</pre>	<pre>base\$gen8<-(- 1)/(log(base\$gen))^(-1/2)</pre>	<pre>base\$gen8<-(- 1)/(log(base\$gen))^(-1/2) base\$gen12<- ((1)/(abs(log(base\$gen)))^(-1/4))</pre>
MGLUR1	SIN TRANSFORMACION	<pre>base\$gen12<- (1)/(abs(log(base\$gen)))^(-1/4)</pre>	<pre>base\$gen12<- (1)/(abs(log(base\$gen)))^(-1/4)</pre>
MGLUR4	SIN TRANSFORMACION	<pre>base\$gen12<- (1)/(abs(log(base\$gen)))^(-1/4)</pre>	<pre>base\$gen2<- (1)/(abs(log(base\$gen)))^(-1/2)</pre>
GPR92	<pre>bc3 <- MASS::boxcox(base\$gen~base\$edad1)</pre>	<pre>base\$gen12<- (1)/(abs(log(base\$gen)))^(-1/4)</pre>	<pre>bc1 <- MASS::boxcox(gen~organano,</pre>

	<pre>(lambda3 <- bc3\$x[which.max(bc3\$y)]) base\$gen15 <- ((base\$gen^lambda3)- 1)/lambda3 (lambda=- 0.02020202)</pre>		<pre>data=filter(base, edad==7)) (lambda1 <- bc1\$x[which.max(bc1 \$y)]) base\$gen13 <- ((base\$gen^lambda1)- 1)/lambda1 base\$gen2<- (1)/(abs(log(base\$gen)))^(-1/2)</pre>
CASR	<pre>base\$gen1<- 1/((base\$gen+1))^2</pre>		