



Siembra

ISSN: 1390-8928

ISSN: 2477-8850

xblastra@uce.edu.ec

Universidad Central del Ecuador
Ecuador

Paillacho Cabrera, Jorge Luis; More Montoya, José Manuel; Aragón Vásquez, Eduardo Fabián; Mena Pérez, Renán Patricio; Quisirumbay Gaibor, Jimmy Rolando

Evaluación de la suplementación de aminoácidos ramificados sobre el desempeño productivo y variables bioquímicas en lechones destetados

Siembra, vol. 9, núm. 2, e3991, 2022, Julio-Diciembre

Universidad Central del Ecuador

Quito, Ecuador

DOI: <https://doi.org/10.29166/siembra.v9i2.3991>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=653871546010>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

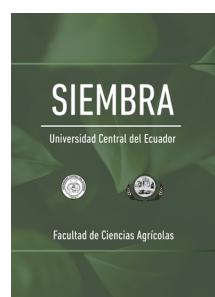
Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Evaluación de la suplementación de aminoácidos ramificados sobre el desempeño productivo y variables bioquímicas en lechones destetados

Evaluation of branched-chain amino acid supplementation on productive performance and biochemical variables in weaned piglets

Jorge Luis Paillacho Cabrera¹, José Manuel More Montoya², Eduardo Fabián Aragón Vásquez³, Renán Patricio Mena Pérez⁴, Jimmy Rolando Quisirumbay Gaibor⁵



Siembra 9 (2) (2022): e3991

Recibido: 20/07/2022 | Revisado: 23/08/2022 / 15/09/2022 | Aceptado: 07/10/2022

¹ Universidad Central del Ecuador. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Jerónimo Leiton y Gato Sobral. 170129. Quito, Ecuador.

✉ jlpaillacho@uce.edu.ec

✉ https://orcid.org/0000-0003-3263-991X

² Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Escuela Profesional de Ingeniería Agropecuaria Filial Santo Tomás, Facultad de Ciencias Agrarias. Av. de la Cultura, Nro. 733. 080101. Cusco, Perú.

✉ mmmoremontoya@gmail.com

✉ https://orcid.org/0000-0001-8677-993X

³ Universidad Central del Ecuador. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Jerónimo Leiton y Gato Sobral. 170129. Quito, Ecuador.

✉ earagon@uce.edu.ec

✉ https://orcid.org/0000-0002-5142-0721

⁴ Universidad Central del Ecuador. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Jerónimo Leiton y Gato Sobral. 170129. Quito, Ecuador.

✉ rpmena@uce.edu.ec

✉ https://orcid.org/0000-0002-4560-4858

⁵ Universidad Central del Ecuador. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Jerónimo Leiton y Gato Sobral. 170129. Quito, Ecuador.

✉ jrquisirumbay@uce.edu.ec

✉ https://orcid.org/0000-0003-1612-8503

*Autor de correspondencia:
jrquisirumbay@uce.edu.ec

Resumen

El destete en mamíferos es un evento de máximo estrés que genera un desgaste metabólico con movilización de nutrientes para el mantenimiento de la homeostasis corporal. Los lechones en el destete experimentan descenso del consumo de alimento y menor rendimiento productivo. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación alimenticia de aminoácidos de cadena ramificada (AACR) en lechones destetados mediante la medición del rendimiento productivo y pruebas bioquímicas en sangre. Se utilizó un total de 16 lechones distribuidos en cuatro tratamientos: T1 = Testigo 1 (sin suplemento lácteo); T2 = Testigo 2 (suplemento lácteo - SL); T3 = SL + 0,5% AACR y T4 = SL + 1% AACR de la composición del suplemento lácteo. Los lechones de los cuatro grupos presentaron un rendimiento productivo similar en todas las variables analizadas: ganancia diaria de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia. Respecto a las variables sanguíneas tampoco se encontró diferencia estadística. La suplementación de AACR a través del alimento no mejoró el rendimiento productivo ni las variables bioquímicas en lechones destetados a los 28 días tras 7 días de administración.

Palabras clave: alimentación, suplementación, porcinos, lechones, aminoácidos.

Abstract

Weaning in mammals is an event of maximum stress that generates metabolic wear with mobilization of nutrients for the maintenance of body homeostasis. Piglets experience decreased feed intake and lower productive performance. The objective of the present study was to evaluate the effect of dietary supplementation of branched-chain amino acids (BCAA) in weaned piglets by measuring productive performance and biochemical blood tests. A total of 16 piglets distributed in four treatments were used: T1 = control 1 (without milk supplement), T2 = control 2 (milk supplement), T3 = milk supplement + BCAA (0.5% form milk supplement composition), T4 = milk supplement + BCAA (1%). The piglets of the four groups presented a similar productive performance in all the variables analyzed: daily weight gain, feed consumption and feed conversion. Regarding blood variables, no statistical difference was found either. BCAA supplementation through feed did not improve productive performance or biochemical variables in piglets weaned at 28 days after 7 days of administration

Keywords: feeding, supplementation, pigs, piglets, amino acids.



1. Introducción

Alteraciones biológicas en el metabolismo, sistema inmunitario y funciones intestinales ocurren durante e inmediatamente después del destete y pueden tener efectos tanto a corto como a largo plazo en el crecimiento y la salud posteriores del lechón, independientemente de la edad a la que se realice el destete. Es fundamental que los porcicultores utilicen estrategias adecuadas de salud, nutrición y manejo para minimizar los efectos adversos del estrés del destete y mejorar el rendimiento productivo hasta llegar al peso de mercado (Campbell *et al.*, 2013). Durante el período posterior al destete, la expresión de proteínas relacionadas con diversos procesos metabólicos o biológicos celulares, como el metabolismo energético, la glicosilación de aminoácidos de las proteínas, el transporte de iones, la vía de señalización mTOR, así como la diferenciación y la apoptosis, se reducen en las células epiteliales yeyunales (células superiores de las vellosidades) de lechones (Wu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2016a, 2016b). Además, el metabolismo de las poliaminas y la expresión de la ornitina descarboxilasa también se vieron alterados por el destete y pueden utilizarse como marcador del crecimiento intestinal y la restitución en cerdos (Wang *et al.*, 2016). El estrés del destete genera una reducción en el consumo de alimento, por tanto, en la ingesta de proteínas y aminoácidos. Estudios demuestran niveles bajos de aminoácidos ramificados en suero de lechones destetados. Al no cubrir los requerimientos nutricionales a partir de la dieta, se da un catabolismo de los aminoácidos desde la reserva muscular (Yin *et al.*, 2020). Los aminoácidos de cadena ramificada (AACR) se utilizan como fuentes principales de energía en las células musculares. La actividad metabólica global en el músculo durante la fase posabsortiva es la destrucción de los AACR y la formación de alanina. La alanina formada es liberada desde las células musculares a la sangre, desde la cual puede ser captada por el hígado para la gluconeogenia (Cunningham y Klein, 2014). Lo mencionado anteriormente demuestra que el destete es una fase crítica que hace uso de los aminoácidos corporales disminuyendo la síntesis proteica, el crecimiento muscular y, por lo tanto, el rendimiento productivo en lechones y la rentabilidad para el productor. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación alimenticia de AACR en lechones destetados mediante la medición del rendimiento productivo y pruebas bioquímicas en sangre.

2. Materiales y Métodos

El presente trabajo de investigación se realizó en el módulo porcino del Centro Experimental Uyumbicho (CEU) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador. Se utilizaron 16 lechones Landrace x Yorkshire x Pietrain x Duroc destetados a los 28 días de edad, los que se asignaron al azar en cuatro tratamientos mediante un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento. La Fase 1 del programa de alimentación (1-27 días de edad) la recibieron todos los lechones antes del destete. Los tratamientos se aplicaron en la Fase 2 del programa de alimentación (28-49 días).

Los cuatro tratamientos fueron: T1 = testigo 1 (sin suplemento lácteo), T2 = testigo 2 (suplemento lácteo), T3 = suplemento lácteo + AACR (0,5%), T4 = suplemento lácteo + AACR (1%). El suplemento lácteo con o sin AACR fue administrado por un período de 7 días (28 hasta los 34 días de edad). Los lechones fueron nutritidos con un alimento comercial cuya composición se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido nutricional dieta comercial utilizada.

Table 1. Nutritional content of the commercial diet used.

	Fase 2
Edad (días)	28-49
Proteína cruda (mín.) (%)	21
Grasa (mín.) (%)	5
Fibra cruda (máx.) (%)	5
Cenizas (máx.) (%)	7
Humedad (máx.) (%)	12

El rendimiento productivo (ganancia diaria de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia) se midieron a los 34 y 41 días de edad. Las pruebas bioquímicas en sangre: creatina cinasa (CK) (por método enzimático), urea (por método GLDH, método completamente enzimático para determinaciones cinéticas de urea), lactato deshidrogenasa (LDH) (por química seca Fujifilm), creatinina (por Reacción Jaffé, prueba fotométrica colorimétrica para mediciones cinéticas de creatinina, método sin desproteinización) y albúmina (por prueba fotométrica colorimétrica para albúmina. Método BCG) se midieron a los 41 días, de acuerdo con lo indicado por HUMAN Gesellschaft Fur Biochemica and Diagnostica mbH (2008). El análisis estadístico se realizó mediante PROC GLM y la prueba de Tukey (en caso de diferencia de medias) en el sistema SAS versión 9.0. El modelo estadístico fue el presentado en la ecuación [1].

$$Y_{ij} = \mu + T_j + \varepsilon_{ij} \quad [1]$$

Donde:

- Y_{ij} = variable respuesta
- μ = media general
- T_j = efecto del j -ésimo tratamiento
- ε_{ij} = error experimental

3. Resultados

En la Tabla 2 se muestra el rendimiento productivo en lechones, medido a los 34 días de edad. En ninguna de las variables evaluadas se encontró diferencia significativa. Los lechones del grupo testigo presentaron una ganancia diaria de peso (GDP) de 264,29 g día⁻¹ y una conversión alimenticia (CA) de 1,17 g g⁻¹. Los lechones que recibieron los AACR al 1% mostraron una GDP de 235,71 g día⁻¹ y una CA de 1,36 g g⁻¹.

Tabla 2. Rendimiento productivo en lechones aw los 34 días de edad.

Table 2. Productive performance in piglets at 34 days of age.

Variable	Testigo 1	Testigo 2	AACR 0.5 %	AACR 1 %	Valor-p
Ganancia diaria de peso (g día ⁻¹)	264,29	187,14	164,29	235,71	0,8366
Consumo diario de alimento (g día ⁻¹)	258,86	290,54	263,57	291,32	0,4998
Conversión alimenticia (g g ⁻¹)	1,17	1,82	2,19	1,36	0,7870

En la Tabla 3 se muestra el resultado de las variables productivas medidas a los 41 días de edad. Se puede observar la tendencia del grupo testigo a presentar la mayor GDP (310,71 g día⁻¹) y la CA más baja (1,75 g g⁻¹), similar a lo reportado para los 34 días de edad. El segundo lugar fue ocupado por el grupo testigo 2 (sustituto lácteo sin AACR) con 303,93 g día⁻¹ y 1,97 g g⁻¹, datos de GDP y CA, respectivamente.

Tabla 3. Rendimiento productivo de lechones a los 41 días de edad.

Table 3. Productive performance of piglets at 41 days of age.

Variable	Testigo 1	Testigo 2	AACR 0.5 %	AACR 1 %	Valor-p
Ganancia diaria de peso (g día ⁻¹)	310,71	303,93	200,00	282,14	0,1384
Consumo diario de alimento (g día ⁻¹)	542,86	592,86	570,71	589,29	0,5871
Conversión alimenticia (g g ⁻¹)	1,75	1,97	2,88	2,11	0,0516

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos de la bioquímica sanguínea, si bien no hubo diferencia significativa se aprecia que los lechones del grupo testigo 1 presentaron los valores más altos en las variables LDH-P (694,50 UL), creatinina (231 uMol L⁻¹) y albúmina (41,35 g dl⁻¹). El tratamiento de AACR al 0,5%

presentó el valor más elevado de CK (2783,25 UL). Mientras que el nivel de 1% mostró el valor más alto de urea (2,95 mMol L⁻¹).

Tabla 4. Variables bioquímicas evaluadas en lechones a los 41 días de edad.

Table 4. Biochemical variables evaluated in piglets at 41 days of age.

Variable	Testigo 1	Testigo 2	AACR 0,5%	AACR 1 %	Valor-p
CK (UL)	1002,25	706,90	2.783,25	1.174,00	0,6546
Urea (mMol/L)	2,45	2,55	1,95	2,95	0,8244
LDH-P (UL)	694,50	614,00	662,50	682,00	0,9789
Creatinina (uMol/L)	231,00	120,90	186,90	95,15	0,1516
Albúmina (g/dl)	41,35	36,90	40,95	36,20	0,1057

4. Discusión

Se ha encontrado que los requerimientos de los aminoácidos ramificados son altos en lechones en crecimiento debido a la necesidad de síntesis de proteína (Wu *et al.*, 2013). En el presente trabajo no se encontró diferencias significativas en el rendimiento productivo entre los lechones de los diferentes tratamientos. Los lechones que fueron suplementados con AACR tanto al 0,5 y 1% (medición día 41), fueron menos eficientes en transformar los nutrientes de la dieta en tejidos corporales a pesar de recibir un mayor nivel de AACR en su ración. Este efecto probablemente se deba a que el nivel de aminoácidos ramificados utilizado en el suplemento generó un bloqueo en la absorción del resto de aminoácidos provenientes del alimento (National Research Council, 2012), ello explicaría la menor ganancia de peso en los lechones y valores de CA más elevados. Los resultados de este trabajo no concuerdan con aquellos en los cuales la suplementación de leucina y valina si favoreció la síntesis de proteína muscular y el crecimiento en lechones (Murgas Torrazza *et al.*, 2010; Suryawan *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2010). La leucina es el AA individual más eficaz para promover la síntesis de proteínas musculares a través de la actividad estimulante de la vía de la rapamicina en mamíferos (mTOR), la adición de leucina en dietas reducidas en el contenido de proteína cruda para regular el crecimiento animal ha sido el foco de muchos estudios previos (Escobar *et al.*, 2005, 2006).

Ren *et al.* (2015) encontraron que la suplementación de L-isoleucina (0,19%), L-valina (0,27%) y L-leucina (0,07%) mejoró el desempeño productivo en lechones al destete frente a una dieta con el mismo nivel de proteína cruda. De manera similar, en dietas bajas en proteína la suplementación de AACR: L-isoleucina (0,19%), L-leucina (0,10%) y L-valina (0,34%) mejoró el rendimiento productivo al compararlo frente a dietas bajas en proteína sin suplementación de AACR. Encontrándose valores similares a los lechones que recibieron una dieta con niveles normales de proteína cruda (Zhang *et al.*, 2013). El consumo diario de alimento fue mayor en el grupo suplementado con AACR a los 34 (291,32 g día⁻¹) y 41 días de edad (589,29 g día⁻¹). Estos resultados concuerdan con los encontrados en la investigación de Zheng *et al.* (2016) en la cual la suplementación de AACR; L-isoleucina (0,17%), L-leucina (0,24%) y L-valina (0,16%) demostró restablecer el consumo de alimento en lechones al destete luego de recibir una dieta deficiente en estos aminoácidos y favoreció el desarrollo muscular. Estudios previos demuestran que el balance de AACR tras su suplementación dietaria mantiene la reserva de AACR en suero, lo que mejoró el rendimiento productivo en lechones con restricción de proteína. Los balances de leucina, valina e isoleucina aumentaron las concentraciones séricas de AACR, respectivamente. Leucina y valina, pero no isoleucina, mejoraron la ingesta de alimento y la ganancia de peso en lechones con restricción proteica (Yin *et al.*, 2020). Cabe recalcar que en el presente estudio el nivel de proteína cruda 21% (mínimo) recibida por los lechones fue similar para los 4 grupos ya que se utilizó una dieta comercial.

Respecto a las variables bioquímicas, al no encontrarse diferencias entre los grupos y al estar dentro del rango considerado como normal, hace suponer que a la edad de 28 días el impacto del destete es menor en los lechones o que la medición de estas debe realizarse de manera más temprana. En los trabajos de Murgas Torrazza *et al.* (2010) y Suryawan *et al.* (2012) el destete se realizó a los 5 días de edad. En los demás estudios el destete se realiza entre los 21 y 28 días (Ren *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2016). Para todos los trabajos el nivel de proteína cruda en la dieta fue inferior al requerido para esa etapa.

Mientras más temprano se realiza el destete mayor es el descenso en el consumo de alimento e inicia un estado de catabolismo. La proteína muscular es utilizada como fuente de energía, deteriorándose el desarrollo muscular del lechón, con alteración de las variables sanguíneas analizadas (Pluske *et al.*, 1997, 2018)

5. Conclusión

La suplementación de AACR no mejoró el rendimiento productivo ni las variables bioquímicas en lechones destetados a los 28 días tras 7 días de administración.

Contribuciones de los autores

- Jorge Luis Paillacho Cabrera: curación de datos, investigación, recursos, redacción – borrador original.
- José Manuel More Montoya: curación de datos, análisis formal, metodología, software, visualización.
- Eduardo Fabian Aragón Vásquez: conceptualización, metodología, supervisión, validación, redacción – borrador original, redacción – revisión y edición.
- Renan Patricio Mena Pérez: conceptualización, adquisición de fondos, metodología, recursos, redacción – borrador original, redacción – revisión y edición.
- Jimmy Rolando Quisirumbay Gaibor: conceptualización, adquisición de fondos, investigación, metodología, administración del proyecto, supervisión, redacción – borrador original, redacción – revisión y edición.

Referencias

- Campbell, J. M., Crenshaw, J. D., y Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of animal science and biotechnology*, 4(1), 1-4. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-19>
- Cunningham, J. G., y Klein, B. G. (2014). *Fisiología veterinaria* (5^a ed.). Elsevier.
- Escobar, J., Frank, J. W., Suryawan, A., Nguyen, H. V., Kimball, S. R., Jefferson, L. S., y Davis, T. A. (2005). Physiological rise in plasma leucine stimulates muscle protein synthesis in neonatal pigs by enhancing translation initiation factor activation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288(5), E914-E921. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00510.2004>
- Escobar, J., Frank, J. W., Suryawan, A., Nguyen, H. V., Kimball, S. R., Jefferson, L. S., y Davis, T. A. (2006). Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290(4), E612-E621. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00402.2005>
- HUMAN Gesellschaft Fur Biochemica and Diagnostica mbH. (2008). *Manual de procedimientos*. HUMAN. <https://www.human.de/>
- Murgas Torrazza, R., Suryawan , A., Gazzaneo, M. C., Orellana, R. A., Frank, J. W., Nguyen, H. V., y Davis, T. A. (2010). Leucine supplementation of a low-protein meal increases skeletal muscle and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs by stimulating mTOR-dependent translation initiation. *The Journal of Nutrition*, 140(12), 2145-2152. <https://doi.org/10.3945/jn.110.128421>
- National Research Council. (2012). *Nutrient requirements of swine* (11th ed.). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/13298>
- Pluske, J. R., Hampson, D. J., y Williams, I. H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock production science*, 51(1-3), 215-236. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(97\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(97)00057-2)
- Pluske, J. R., Turpin, D. L., y Kim, J. C. (2018). Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutrition*, 4(2), 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.004>
- Ren, M., Zhang, S. H., Zeng, X. F., Liu, H., y Qiao, S. Y. (2015). Branched-chain amino acids are beneficial to maintain growth performance and intestinal immune-related function in weaned piglets fed protein restricted diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(12), 1742. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0131>
- Suryawan, A., Murgas Torrazza, R., Gazzaneo, M. C., Orellana, R. A., Fiorotto, M. L., El-Kadi, S. W., y Davis, T. A. (2012). Enteral leucine supplementation increases protein synthesis in skeletal and cardiac muscles

- and visceral tissues of neonatal pigs through mTORC1-dependent pathways. *Pediatric Research*, 71(1), 324-331. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.79>
- Wang, J., Tan, B. E., Li, G. R., Xiao, H., Huang, B., Zhang, M. H., y Yin, Y. L. (2016). Polyamine metabolism in the intestine of piglets is altered by weaning and proline supplementation. *Journal of Animal Science*, 94(suppl_3), 423-428. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9464>
- Wu, F., Xiong, X., Yang, H., Yao, K., Duan, Y., Wang, X., y Yin, Y. (2017). Expression of proteins in intestinal middle villus epithelial cells of weaning piglets. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 22(4), 539-557. <https://doi.org/10.2741/4501>
- Wu, G., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, W., Liu, C., y Yin, Y. (2013). Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids*, 44(4), 1107-1113. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1444-2>
- Yang, H., Wang, X., Xiong, X., y Yin, Y. (2016a). Energy metabolism in intestinal epithelial cells during maturation along the crypt-villus axis. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep31917>
- Yang, H., Xiong, X., Wang, X., Tan, B., Li, T., y Yin, Y. (2016b). Effects of weaning on intestinal upper villus epithelial cells of piglets. *PloS one*, 11(3), e0150216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150216>
- Yin, J., Ma, J., Li, Y., Ma, X., Chen, J., Zhang, H., y Yin, Y. (2020). Branched-chain amino acids, especially of leucine and valine, mediate the protein restricted response in a piglet model. *Food & function*, 11(2), 1304-1311. <https://doi.org/10.1039/C9FO01757G>
- Yin, Y., Yao, K., Liu, Z., Gong, M., Ruan, Z., Deng, D., y Wu, G. (2010). Supplementing L-leucine to a low-protein diet increases tissue protein synthesis in weanling pigs. *Amino Acids*, 39(5), 1477-1486. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0612-5>
- Zhang, S., Qiao, S., Ren, M., Zeng, X., Ma, X., Wu, Z., Thacker, P., y Wu, G. (2013). Supplementation with branched-chain amino acids to a low-protein diet regulates intestinal expression of amino acid and peptide transporters in weanling pigs. *Amino Acids*, 45(5), 1191-1205. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1577-y>
- Zheng, L., Wei, H., Cheng, C., Xiang, Q., Pang, J., y Peng, J. (2016). Supplementation of branched-chain amino acids to a reduced-protein diet improves growth performance in piglets: involvement of increased feed intake and direct muscle growth-promoting effect. *British Journal of Nutrition*, 115(12), 2236-2245. <https://doi.org/10.1017/S0007114516000842>