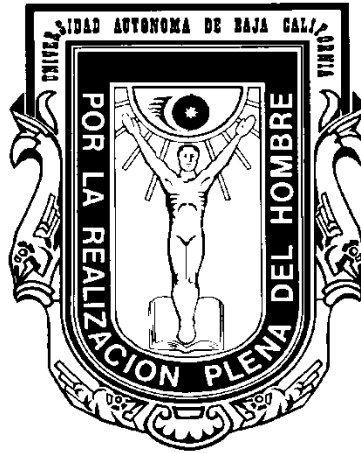


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS



**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE LEUCINA A DIETAS BASE TRIGO BAJAS EN PROTEÍNA CRUDA
EN COMPORTAMIENTO Y EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS Y
MIOSINA PARA CERDOS EN CRECIMIENTO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS EN PRODUCCION ANIMAL

PRESENTA:

JOSE HECTOR GARCIA VILLALOBOS

DIRECTOR DE TESIS:

Ph. D. MIGUEL CERVANTES RAMIREZ

MEXICALI, ENERO del 2011

Consejo Particular

PRESIDENTE

Dr. Miguel Cervantes Ramírez

SINODAL

Dra. Adriana Morales Trejo

SINODAL

Dr. Benedicto Alfonso Araiza Piña

SINODAL

“POR LA REALIZACION PLENA DEL HOMBRE”

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

Este experimento se realizó para evaluar el efecto de la adición de leucina a dietas a base de trigo en el comportamiento productivo y expresión de los genes de miosina y transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT-1 y $b^{0,+}$) en yeyuno, músculo largo dorsal (MLD) y semitendinoso (MST). Para identificar los aminoácidos (AA) asociados a mecanismos celulares que regulan la síntesis de proteína muscular, y determinar si leucina (Leu) provoca una respuesta adicional a la de lisina (Lys), treonina (Tre) y metionina (Met) en dietas base trigo. Se utilizaron 20 cerdos (Landrace x Hampshire x Duroc), 14.9 ± 0.27 kg peso inicial. Asignados a cuatro tratamientos, en base al sexo, peso, edad y camada, de acuerdo con un diseño de bloques completos al azar. Los tratamientos fueron los siguientes: T1) dieta base con 95.64 % de trigo la cual arbitrariamente era deficiente para cubrir los requerimientos de lisina, Treonina y metionina (LMT). T2) Igual a T1 + 0.88 % de Lys, 0.27% Tre y 0.10% de Met T3) T2 + 0.80% de Leu, T4) Una dieta típica trigo-pasta de soya la cual cubre los requerimientos de AA (1.05% Lys). El experimento tuvo una duración de 20 días. Los resultados de ganancia de peso (GDP), consumo de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA) de los cerdos del T1, T2, T3 y T4, respectivamente, fueron los siguientes: GDP, 0.25, 0.80, 0.64, 0.73 kg/d; CDA, 0.75, 1.20, 0.98, 1.08 kg/d; CA, 3.02, 1.51, 1.55, 1.49. La adición de LMT a la dieta base incrementó ($P < 0.001$) la GDP, CDA y CA. La inclusión adicional de Leu redujo la GDP y CDA ($P < 0.01$), pero no afectó la CA ($P > 0.10$). La GDP tendió a ser mayor ($P = 0.09$) en los cerdos con la dieta con LMT que en los testigo, pero no hubo diferencias en CDA o CA. En lo que respecta a la expresión del RNAm de $b^{0,+}$ en intestino delgado (yeyuno). Se observó el incremento ($P = 0.019$) en la expresión del gen por efecto de la adición de LTM a la dieta base. Además, se observa una reducción marcada ($P = 0.031$) en la expresión por efecto de adicionar Leu a la

dieta LMT. Asimismo, se observó un decremento ($P = 0.006$) en la expresión de $b^{0,+}$ en los cerdos que recibieron la dieta testigo en comparación con los de la dieta LMT. En la expresión del gen CAT-1 se observa un incremento ($P=0.007$) dieta base en la expresión del gen al compararla con LMT. Al comparar LMT vs LMT+Leu no hay diferencia entre tratamientos ($P=0.2997$). Pero, al comparar LMT vs Testigo existe un aumento ($P<0.01$) en la expresión de este gen. Por otra parte, con respecto al MLD, se observa que la adición de LMT a la dieta base incrementa la expresión de CAT-1 ($P<0.001$). Sin embargo, la inclusión adicional de leucina a la dieta LTM redujo su expresión ($P<0.001$). Asimismo, la expresión de este gen fue menor en los cerdos que recibieron la dieta testigo, en comparación con los de la dieta LTM ($P = 0.002$). Los resultados del gen miosina (MYO) En MST hay un incremento ($P<0.001$) al comparar la dieta base con la dieta LMT. Pero se observa una reducción ($P<0.0001$) al adicionar Leu. También se observa una reducción ($P<0.0001$) en la expresión al comparar la dieta LMT contra la dieta Testigo. Por otra parte en el MLD no se observó efecto en la expresión de MYO debido a la adición de los primeros tres aminoácidos limitantes ($P=0.860$) ni a la dieta testigo ($P=0.843$). La adición de leucina a la dieta base con LTM incrementó ($P=0.003$) la expresión de MYO. Sin embargo, cuando se comparó la expresión de MYO en los cerdos que recibieron la dieta adicionada con LTM+Leu contra la dieta base y testigo, se observaron valores sustancialmente mayores ($P=0.002$). Por consiguiente, el nivel en la dieta de AAs neutros y catiónicos así como también la abundancia y la actividad de transportadores de AA pudo afectar la disponibilidad de AA y la síntesis de proteína.

CONTENIDO

RESUMEN.....	5
CONTENIDO.....	7
INDICE DE CUADROS.....	9
INDICE DE FIGURAS.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES.....	12
2.1 PERSPECTIVA Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA NUTRICIÓN DE CERDOS.....	12
2.2 LA IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA EN LA ALIMENTACIÓN DE GANADO PORCINO.....	12
2.2.1 DIETAS TÍPICAS (PROTEÍNA INTACTA).....	13
2.2.2 DIETAS BAJAS EN PROTEÍNA.....	14
2.2.2.1 VENTAJAS.....	15
2.2.2.2 DESVENTAJAS.....	15
2.3 LOS AMINOÁCIDOS EN LA NUTRICIÓN DE CERDOS.....	17
2.3.1 CLASIFICACIÓN.....	18
2.3.2 ESENCIALIDAD.....	18
2.3.3 LIMITANCIA.....	19
2.3.4 AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA.....	20
2.4 DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA EN CERDOS.....	21
2.5 ABSORCIÓN INTESTINAL Y TRANSPORTE CELULAR DE AA.....	22
2.5.1 MECANISMOS.....	23
2.5.2 CLASIFICACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES.....	25
2.5.3 MODO DE ACCIÓN.....	26
2.6 SÍNTESIS DE PROTEÍNA.....	27
2.6.1 EL PAPEL FUNDAMENTAL DE mTOR.....	28
2.6.2 AMINOÁCIDOS Y mTOR.....	29
3. HIPOTESIS.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1 ANIMALES.....	33
5.2 DIETAS.....	33
5.3 SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS.....	35
5.4 ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	35
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1 COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO.....	40
6.2 EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNM PARA B0,+ Y CAT-1.....	42
6.4 EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN MIOSINA.....	47
7. CONCLUSION.....	50
8. LITERATURA CITADA.....	51

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.- CLASIFICACIÓN NUTRICIONAL DE LOS AMINOÁCIDOS PARA CERDO (LEWIS 2001).....	19
CUADRO 2. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EN MAMÍFEROS (GASOL, 2004).....	26
CUADRO 3.- COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES.....	34
CUADRO 4. OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS PARA PCR TIEMPO REAL.....	37
CUADRO 5. .- GANANCIA DIARIA DE PESO (GDP), CONSUMO DE ALIMENTO (CDA) Y CONVERSIÓN ALIMENTICIA (CA) DE CERDOS EN CRECIMIENTO ALIMENTADOS CON LAS DIETAS EXPERIMENTALES).....	41
CUADRO 6 .- EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE AMINOÁCIDOS B ^{0,+} EN INTESTINO DELGADO (YEYUNO)	42
CUADRO 7.- EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA MIOSINA (MYO) EN MUSCULO SEMITENDINOSO (MST) Y MUSCULO LARGO DORSAL (MLD).....	47

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- DIFERENTES TIPOS DE SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AA (LIAO, 2009).....	26
---	----

1. INTRODUCCIÓN

El cerdo se encuentra entre los animales más eficientes para producir carne y, por su gran capacidad transformadora de nutrientes, le hacen especialmente atractivo como fuente de alimentación para los humanos. Por el valor nutritivo de la carne de cerdo esto lo señala como uno de los alimentos más completos para satisfacer las necesidades alimenticias del hombre.

Además, la producción porcícola en México tiene importancia económica de relevancia. Solo en México, la porcicultura ocupa el tercer lugar en importancia por su aportación a la producción total de cárnicos 1, 741,966 toneladas de carne (SAGARPA, 2009), por lo tanto el aumento en la producción de carne magra tendrá un impacto importante en los sistemas productivos del país. Así mismo, su mayor relevancia es que proporciona un conjunto de productos importantes en la dieta de los estratos de bajos ingresos de la población, además que usa en forma indirecta amplias superficies agrícolas y da lugar a una amplia y compleja cadena productiva que incluye la producción de cereales y otros productos. Así como también, la industrialización de la carne. (SAGARPA 1998)

Por lo antes mencionado resulta imprescindible conocer el efecto que tendrán las dietas que se le proporcionan a los animales, pero no solo en el comportamiento productivo, si no también utilizar las herramientas que en la actualidad se cuenta para conocer que sucede a nivel celular y de esta manera mejorar nuestra producción

1.1 JUSTIFICACIÓN

Una función importante en la producción animal es proveer proteína de alta calidad para la alimentación humana. Por ello es imprescindible mejorar la nutrición de los cerdos y por lo tanto aumentar su eficiencia productiva. De esta manera la producción puede hacerse rentable y se puede contribuir a reducir el impacto negativo de la producción en la contaminación ambiental. Una estrategia para conseguir ambos propósitos consiste en diseñar programas de alimentación con dietas que provean los nutrientes que el animal necesita pero sin excesos. Sin embargo, debido al desequilibrio en el contenido de nutrientes de los ingredientes típicos con respecto a los requerimientos de los animales, las dietas típicas generalmente proveen excesos de algunos nutrientes, específicamente de aminoácidos (AA). Por tanto, la modificación en la formulación de las dietas que favorezca el equilibrio entre AA, puede resultar en una mejora de la eficiencia productiva de los cerdos y en la rentabilidad de la explotación porcícola. La formulación de dietas bajas en proteína cruda, asociada a la suplementación de AA libres puede ser una estrategia que favorezca la mejora en la eficiencia indicada.

Asimismo, esta modificación en la formulación de las dietas puede contribuir a reducir la contaminación ambiental debido a que niveles bajos de proteína cruda en las dietas para cerdos disminuyen los niveles de nitrógeno excretado y con ello la contaminación de suelos y aguas circundantes a las granjas porcícolas.

2. ANTECEDENTES

2.1 PERSPECTIVA Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA NUTRICIÓN DE CERDOS

La alimentación de los animales en el sistema intensivo representa del 65 al 70 % del costo de producción, por lo que debe ser muy eficiente en el uso de los ingredientes y la formulación de sus dietas, aunado a una buena determinación de los requerimientos nutricionales y el análisis correcto del contenido de nutrientes. Los requerimientos están influenciados por una combinación del potencial de crecimiento y el consumo voluntario, los cuales requerirán cambiar la concentración del nutriente en la dieta y conocer los requerimientos de los cerdos en base a una cantidad por día (Dritz *et al.*, 1997)

2.2 LA IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA EN LA ALIMENTACIÓN DE GANADO PORCINO

Una de las dificultades más importantes en la elaboración de dietas para ganado porcino es la determinación precisa de los requerimientos de aminoácidos y el balance energético en las dietas para satisfacer las necesidades y de esta manera atender los diferentes tipos que demanda en un mercado que cada vez ha de ser más exigente (Borja y Mendel, 1998) y ha llevado a la evolución de un cerdo grasoso a uno magro

El musculo está compuesto varios elementos dentro de estos son las proteínas musculares que están formadas por unidades simples llamados “aminoácidos” ligados en

largas cadenas. Estas cadenas, compuestas por cientos o miles de estos unidos en secuencias específicas. La formación de proteínas corporales requiere la presencia simultánea de unos 20 aminoácidos distintos a nivel celular. Algunos pueden ser sintetizados a partir de otros, para el cerdo se reconocen diez aminoácidos esenciales lisina, treonina, metionina, leucina, valina, isoleucina, triptófano, fenilalanina, histidina y arginina (Lewis , 2001). Ya que los cerdos tienen un potencial genético dado para formar tejido muscular y una determinada tasa diaria, así que la alimentación optima debe proveer la energía y los aminoácidos necesarios para este fin

2.2.1 DIETAS TÍPICAS (PROTEÍNA INTACTA)

Se puede definir a las dietas típicas como aquellas que contienen la cantidad de proteína cruda adecuada según los requerimientos nutrimentales para el máximo crecimiento por etapa productiva, para cubrir estos requerimientos se han propuesto diversos sistemas para formular las dietas para cerdos, uno de estos es “proteína ideal”, que se refiere a la cantidad de proteína en la dieta, que debe tener una adecuada relación de los aminoácidos cubriendo las necesidades del animal tomando como referencia a Lisina (Lewis, 2001) el cual es el primer aminoácido limitante en nutrición de cerdos

Por lo tanto, los animales requieren dietas que contengan un nivel de proteína adecuado para su óptimo crecimiento. Katz *et al.* (1973) alimentaron cerdos en etapa de crecimiento con dietas maíz pasta de soya con un nivel de 16% es decir 3 unidades debajo

de su requerimiento de proteína y observaron que los animales tuvieron una ganancia de peso menor comparado con los cerdos alimentados con dietas con los mismos ingredientes pero con 19% de proteína cruda. Esto indica la necesidad de la cantidad de proteína requerida para el ganado porcino

Por otra parte es importante tomar en cuenta los ingredientes de las dietas para evitar un comportamiento productivo bajo y la contaminación ambiental, ya que, animales que se alimentaron con dietas sorgo pasta de soya no tuvieron un comportamiento productivo similar a los alimentados con maíz pasta de soya (Trujillo *et al* 2007). Posiblemente por el perfil de aminoácidos de los granos, también se estima que los animales que recibieron la dieta con sorgo, desecharon mayor cantidad de aminoácidos. Por lo tanto, es importante considerar los excesos de AA, dado que con el método proteína ideal, los niveles totales de casi todos los aminoácidos, se encuentran por arriba de su requerimiento

2.2.2 DIETAS BAJAS EN PROTEÍNA

Este tipo de dieta s comenzaron a utilizarse en los años 60's debido en gran manera por el alto costo de los compuestos proteicos (Meade *et al* 1965), mas adelante en 1981, debido a un mejor conocimiento del metabolismo proteico y la aparición en el mercado de los aminoácidos cristalinos (lisina, metionina, treonina y triptófano) se pueden proporcionar al animal una cantidad constante de los aminoácidos esenciales con

respecto a lisina y reducir la cantidad de proteína en la dieta (ARC, 1981) por lo que es importante conocer los requerimientos exactos para una producción eficiente

Pero, la determinación de los requerimientos de aminoácidos para animales se ha realizado de manera factorial incluyendo la velocidad de crecimiento, la composición de los aminoácidos de las proteínas musculares y las necesidades para funciones de mantenimiento (NRC, 1998). Pero no se considera los aminoácidos que se requieren para la síntesis de enzimas y hormonas de naturaleza proteica que participan en los procesos de digestión y absorción de aminoácidos en la dieta y la síntesis de proteínas en las células

Por lo anterior, se sabe que una deficiencia de algún aminoácido dará lugar a una mala tasa de crecimiento, conversión o un mal resultado reproductivo (Lewis 2001). Pero sobre todo su capacidad para producir tejido magro (Baker *et al.* 1998) que en la actualidad es el principal objetivo en los sistemas de producción de cerdos

2.2.2.1 VENTAJAS

Reducir costos y precisar el potencial nutritivo de los alimentos, es decir, la cantidad de nutrientes disponibles para el metabolismo animal, es esencial para ajustar el aporte de nutrientes a las necesidades de los cerdos, diversos estudios han publicado que se puede reducir la proteína en 4% en dietas maíz-pasta de soya (Kerr *et al.*, 1995) o sorgo-pasta de soya (Hansen *et al.*, 1993), o reduciendo 5.5% la proteína en dietas maíz-

cebada-trigo-pasta de soya sin alterar negativamente la ganancia de peso (Le Bellego *et al.*, 2001)

Las dietas bajas en proteína adicionada con aminoácidos sintéticos han sido ampliamente estudiadas para probar su eficiencia. Por ejemplo, Blank (1986) midió retenciones de 23 g de nitrógeno frente a 20 g/día, cuando incrementan el nivel de lisina (0,1%) de esta manera se evita el efecto negativo de ofrecer una dieta baja en proteína y hacer eficientes los procesos productivos

Así también la estrategia para reducir la excreción de aminoácidos en general, es una mayor eficiencia alimenticia lo cual conduce a una menor excreción de aminoácidos. Dado que una mejora en el índice de conversión de 0,1 unidades reduce la excreción de nutrientes en un 3% (Coffey, 1996). Esto se debe a que los organismos de los seres vivos utilizan con alta eficiencia todos los sustratos

También Boisen *et al.* (1991) demostraron que dietas bajas en proteína suplementadas con aminoácidos reducían la excreción de nitrógeno en alrededor de un 24% sin afectar a la velocidad de crecimiento de los cerdos. Schutte *et al.* (1993) determinaron que por cada unidad porcentual que se reduce el nitrógeno del alimento, la excreción de nitrógeno disminuye un 10%. Esto es un indicador del claro exceso de nitrógeno en comparación con dietas típicas

2.2.2.2 DESVENTAJAS

En la producción porcina es necesario tener animales de raza alta productora de musculo dado que las diferencias en las necesidades relativas de proteínas y aminoácidos en relación a la energía por raza (Black, 1991) indican que si los animales no tienen un buen potencial genético, la dieta no será aprovechada eficientemente en crecimiento muscular

Factores como la utilización diferencial de los nutrientes según las funciones metabólicas, la edad y el estado fisiológico, sobre la capacidad digestiva de los animales o sobre la disponibilidad de los nutrientes hacen su aplicación industrial una fuerte limitante. Guay *et al.* (2006) señalan que la morfología intestinal se altera negativamente cuando los cerdos se alimentan con dietas con baja proteína. Lo que conduce a una menor respuesta productiva en comparación con los cerdos alimentados con dieta típica

Así también existe evidencia que los animales alimentados con dietas bajas en proteína tienen un comportamiento productivo similar en los parámetros de ganancia de peso y conversión alimenticia. Pero, al sacrificar estos animales tienen canales con mayor porcentaje de grasa corporal en comparación con los alimentados con dietas típicas cereal-pasta de soya (Kerr *et al.*, 1995; Tuitoek *et al.*, 1997). Esto deja la incógnita de conocer si los aminoácidos adicionados a dietas con proteína baja no se encuentran presentes en las a nivel celular en el momento correcto

2.3 LOS AMINOÁCIDOS EN LA NUTRICIÓN DE CERDOS

Los aminoácidos son parte fundamental en la nutrición de cerdos, puesto que existe evidencia (Fan *et al* 2008) que hace suponer que además tienen funciones metabólicas y no solo como unidades de construcción de las proteínas (Sreekumaran y Short, 2005), entonces el nivel de aminoácidos en las dietas será determinante para la producción

Las dietas bajas en proteína carecen de los tres primeros aminoácidos limitantes, esto se comprobó con cerdos alimentados con dietas bajas en proteína no hubo un crecimiento eficiente (Baker 1983). Pero, si se les da una mezcla que cubra los requerimientos de aminoácidos (Shelton *et al*, 1950) los animales tienen un buen comportamiento productivo

2.3.1 CLASIFICACIÓN

Los aminoácidos se clasifican de diversas maneras, esto va a depender directamente de la ciencia se refiera, y en nutrición animal se pueden clasificar en dos tipos que son los limitantes y no limitantes y otra forma de clasificarlos es en esenciales y no esenciales (Lewis 2001) estas clasificaciones son cruciales para un máximo aprovechamiento de los aminoácidos

2.3.1 ESENCIALIDAD

De los 20 aminoácidos que constituyen comúnmente a las proteínas algunos deben ser estrictamente componentes en las dietas de cerdo, la razón es que los animales sintetizan en cantidad insuficiente para un crecimiento óptimo a estos aminoácidos se le conocen como aminoácidos esenciales (Cuadro 1) es necesario que todos los aminoácidos estén en una cantidad y proporción correcta. Por ejemplo, La cantidad de aminoácidos esenciales en el trigo es superior al del maíz (Sauer *et al.*, 1981) y sorgo (Lin *et al.*, 1987; Cervantes *et al.*, 1997)

Cuadro 1.- Clasificación nutricional de los aminoácidos para cerdo (Lewis 2001)

ESENCIAL	NO ESENCIAL
Arginina	Alanina
Histidina	Asparagina
Isoleucina	Acido aspartico
Leucina	Cisteína
Lisina	Acido glutamico
Metionina	Glutamato
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptófano	Serina
Valina	Tirosina

Por tanto, es importante conocer mejor el valor nutricional de la proteína de los cereales, la cual se determina por su composición, digestibilidad y disponibilidad de AA y por la respuesta que provoca en el crecimiento de los animales (Araiza *et al* 2003), los cereales son considerados principalmente como fuentes de energía; sin embargo, debido a que su contenido en dietas para cerdos en crecimiento-finalización es superior a 80%,

éstos contribuyen con más de 50% del requerimiento de los AA esenciales de esos cerdos (NRC, 1998)

2.3.3 LIMITANCIA

En nutrición de cerdos, el termino de aminoácido limitante se refiere al aminoácido que se encuentra en el ingrediente en cantidad insuficiente para el máximo crecimiento del animal, un ejemplo claro es lisina en el trigo donde han reportado contenidos de 0.72% (Araiza *et al* 2003) y el requerimiento para cerdos es 1.05% (NRC, 1998) esta deficiencia se presenta en la mayoría de los granos de las dietas típicas de los cerdos (Boisen *et al.* 1991)entonces el aporte de este aminoácido en las dietas es por debajo del nivel optimo para el crecimiento del animal

Entonces, dado que el crecimiento máximo de los cerdos se da cubriendo los requerimientos de los aminoácidos, trabajos en esta institución como el de Méndez *et al* (2009), que adicionaron a dietas base trigo los tres aminoácidos limitantes que son lisina treonina y metionina en forma libre para cubrir al 100% los requerimientos con un optimo comportamiento productivo con cerdos en crecimiento

2.3.4 AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA

Leucina, isoleucina y valina por su estructura química están clasificados como aminoácidos de cadena ramificada (Mathews, 2003), pero también en la nutrición de cerdos son clasificados como aminoácidos esenciales, hay reportes que en las dietas base trigo, isoleucina, valina y leucina se sitúa en cuarto, sexto y decimo lugar respectivamente (Araiza *et al* 2003) por esta situación existe escasa información al respecto de sus requerimientos exactos

Por lo tanto, su cantidad es solamente estimada (Cervantes *et al* 2003), entonces, posiblemente la proporción de los aminoácidos de cadena ramificada en dietas bajas en proteína, provocaría que se convirtieran en AA limitante reduciendo así la disponibilidad a nivel celular provocando disminución de la síntesis de proteína

Estudios *in vitro* con tejidos celulares y además *in vivo* con roedores (Kimball y Jefferson, 2004), señalan que Leucina participa en el complejísimo proceso de síntesis de proteína muscular participando en la vía de señalización de mTOR (Greiwe *et al.*, 2001). Pero los estudios señalan que no se sabe con exactitud como sucede este proceso

2.4 DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA EN CERDOS

El cerdo en etapa de crecimiento es el modelo animal que ha sido utilizado para desarrollar los programas modernos de alimentación y además en la determinación de los coeficientes de digestibilidad ileal de la proteína y aminoácidos (NRC, 1998). Por lo tanto es una herramienta para determinar la cantidad de la dieta se va absorber al interior del animal, es decir el coeficiente de digestibilidad

Entonces, para poder conocer la cantidad de nutrientes que se van a digerir es importante conocer el coeficiente de los ingredientes por lo tanto La digestibilidad de los aminoácidos es uno de los factores más importantes, para calificar la calidad de la dieta y la respuesta productiva de los animales (Cervantes, 2000) a fin de evitar deficiencias alimenticias en los cerdos

Por tal motivo, se hace la recomendación de formular las dietas para los cerdos en base a la digestibilidad ileal verdadera (Stein *et al* 2007), en especial cuando se utilizan como ingredientes de la dieta, aminoácidos cristalinos o bien cuando se utilizan ingredientes de baja digestibilidad (Stein *et al* 2007)

La razón de que se recomiende la digestibilidad hasta el final del intestino delgado es que diversos trabajos señalan que en este, se encuentra la mayor actividad digestiva de la proteína y los aminoácidos (Sauer *et al* 1980, Bröer, 2008) por lo tanto la digestibilidad

ileal está mejor correlacionada con la deposición de proteína corporal que la digestibilidad fecal (Dierick *et al* 1988)

2.5 ABSORCIÓN INTESTINAL Y TRANSPORTE CELULAR DE AA

Las proteínas ingresan al cerdo a través de los ingredientes de la dieta, por el aparato digestivo, ahí por medio de diversas reacciones fisicoquímicas y enzimáticas, se fragmenta en aminoácidos, con la finalidad de que las células del organismo puedan formar nuevas moléculas de proteína que se requieran (Ferket *et al.*, 2002) y cubrir las necesidades del animal

Para esto los aminoácidos son transportados al interior del organismo a través de las células epiteliales localizadas en el intestino delgado, ahí es llevado a cabo el proceso de la absorción de los aminoácidos, ya que el transporte de AA desempeña la función crítica para mantener un flujo nutricional (Christensen, 1990) para realizar las funciones metabólicas de los órganos del cuerpo

La absorción a nivel celular va a estar dada por varios sistemas de transporte donde participan “proteínas transportadoras”, y estas a su vez varían en capacidad, especificidad y sustratos (Bröer, 2008), las proteínas reconocen al aminoácido, se unen y transportan a estos del medio extracelular al interior de la célula o viceversa

Se han identificado diferentes sistemas de transporte de aminoácidos para mamíferos con especificidades de sustrato amplias (diferentes aminoácidos comparten el mismo sistema de transporte) y solapadas (un mismo aminoácido puede ser transportado por varios sistemas). Esta disposición permite, por un lado, una fina regulación del flujo de aminoácidos tanto a nivel celular como entre órganos y, por otro, una economía de estructuras mediando dichos flujos (Christensen, 1990)

Cada tipo celular de un organismo contiene una combinación determinada de transportadores en sus membranas. Esta combinación depende de su función biológica y es el resultado de la presencia de los sistemas de transporte ubicuos en alguna de sus variantes (p. ej. sistemas A, ASC, L, γ +, XAG) y de los sistemas de transporte tejido-específicos (p. e. sistemas B^{0,+}, Nm, b^{0,+}) (Palacín *et al.*, 1998)

La finalidad de estos procesos fisiológicos es poder llevar a cabo, un sin número de eventos tales como por citar solo unos ejemplos están la síntesis de proteína, regulación del metabolismo, el crecimiento celular, y la producción de energía, entre otros. (Whittemore, 2001) buscando siempre un equilibrio en las concentraciones de los aminoácidos a nivel celular

2.5.1 MECANISMOS

Mecanismo antiporte: Constituyen la gran mayoría de los transportadores de aminoácidos en mamíferos. Preferentemente, intercambian aminoácidos no esenciales por aminoácidos esenciales. Permiten generar asimetrías, clave para el flujo vectorial de aminoácidos. Un ejemplo es la reabsorción de aminoácidos en el riñón (sistema $b^{0,+}$, sistema L, sistema γ^+L).

Mecanismo cotransporte: participan los transportadores de osmolitos (sistema β), que mantienen altas concentraciones de gradiente de sustratos en el riñón; o los transportadores apicales que median la reabsorción de aminoácidos en el epitelio (sistema $BO,+$).

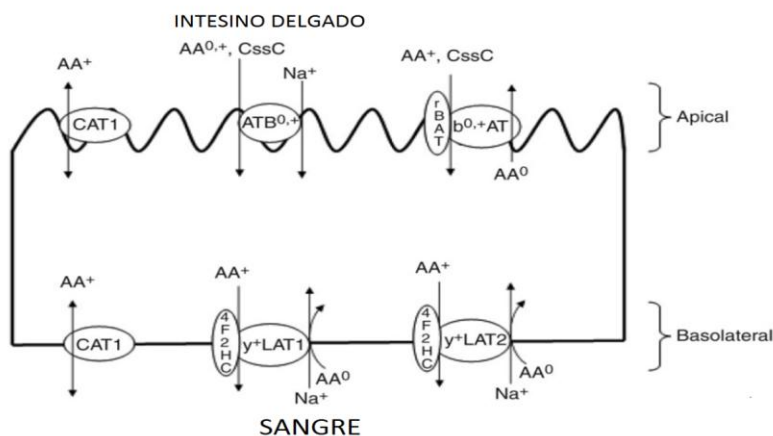
Mecanismo Uniporte: Son asociados al cotransporte de Na^+ o H^+ , o bien se les denominan Uniporte. Parecen implicados en mantener altas las concentraciones citosólicas de aminoácidos no esenciales (Ej. sistema A, sistema N) para permitir posteriormente la entrada de aminoácidos esenciales por otros transportadores (antiporters). La abundancia de Uniporte (sistema γ^+ , sistema T) es muy baja debido, quizás, a ser un mecanismo que no protege a la célula de la pérdida de metabolitos importantes ya que cambios en el contenido de aminoácidos en el plasma se trasladan al contenido intracelular (Gasol, 2004).

2.5.2 CLASIFICACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES

La clasificación de los diferentes sistemas de transporte se realiza siguiendo criterios de funcionalidad: tipo de aminoácido transportado y dependencia del ión sodio. La nomenclatura adoptada utiliza acrónimos indicativos de la especificidad de sustrato y designa con mayúsculas los sistemas sodio-dependientes y con minúsculas los sodio-independientes (Bannai *et al.*, 1984).

- Transportadores de débil capacidad de acumulación (ATA, SN, CAT, TAT): son transportadores asociados al cotransporte de Na^+ o H^+
- Antiporters o intercambiadores (LAT, γ^+ LAT, xCT, $\text{b}^{0,+}$ AT): constituyen la gran mayoría de los transportadores de aminoácidos en mamíferos. Preferentemente, intercambian aminoácidos no esenciales por aminoácidos esenciales

Figura 1.- diferentes tipos de sistemas de transporte de AA (Liao, 2009)



Este modelo presenta los sistemas de transportadores catiónicos asociados a las proteínas expresadas en intestino delgado, las flechas indican la dirección del movimiento del aminoácido, figura realizada con datos de Deves y Boyd (1998), Krehbiel y Matthews (2003), Dave *et al.* (2004), y Broer (2008).

2.5.3 MODO DE ACCIÓN

El traslado de los AA del medio extra celular hacia el interior de la célula se da en la membrana celular, este proceso se encuentra mediado por proteínas transportadoras, y se conocen diversas proteínas transportadoras específicas para tipos de aminoácidos, diferentes tipos de células y para cada momento fisiológico determinado (Lodish *et al.* 2005) por lo antes mencionado, es un punto crítico para el crecimiento optimo del animal

Entonces la expresión diferencial de los mRNA que codifican a las proteínas se encuentra regulada mediante la transcripción diferencial de los genes para esas proteínas y su traducción (Cuadro 2), pero también a nivel de la biología celular, dichas proteínas pueden requerir de activación mediada por rutas de señalización celular, activación a nivel bioquímico o, incluso, de localización en la membrana (Alberts *et al* 2004)

Cuadro 2.- Sistemas de transporte de AA en mamíferos (Gasol, 2004)

Sistema de transporte	Isoformas (cDNAs Clonados)	Mecanismo	Sustratos
Y+	CAT-1 CAT-2A/B CAT-3 CAT-4	Uniporte	Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys
b ^{0,+}	b ^{0,+} AT/rBAT	Antiporte	Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys

2.6 SÍNTESIS DE PROTEÍNA

El proceso mediante el cual el organismo produce diferentes tipos de proteína, se le conoce como síntesis de proteína o también es llamada traducción, la cual se realiza en tres etapas: iniciación, elongación y terminación (Wang y Proud, 2006), este proceso dará como resultado una proteína con una función específica para el organismo

Así mismo, la síntesis de proteína en las células musculares es un proceso bien organizado en el que participan diversos componentes, en diferentes etapas bien definidas (Hayashi y Proud, 2007). Extracelularmente se encuentra la hormona de crecimiento, Factor de crecimiento insulínico tipo 1 e insulina, estos, envían señales a través de sus receptores transmembrana hacia el interior de la célula para activar la maquinaria de síntesis.

Ya que se mando la señal se transmite hacia el núcleo y ribosomas mediante fosforilaciones en cadena de proteínas. El principal regulador de esta vía de señalización para la síntesis de proteína muscular complejo molecular denominado blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR) (Miyazaki y Karyn 2008), diversos artículos científicos señalan que los AA podrían participar de forma activa en la síntesis de proteína

Dado que este proceso se lleva a cabo cuando todos los aminoácidos integrantes de la proteína se encuentran en las cantidades requeridas y en un mismo momento, por lo

tanto la concentración de los aminoácidos en la célula se supone forme parte del llamado mecanismo de activación de la maquinaria responsable de la síntesis de proteína.

Entonces la presencia o nivel de concentración de los aminoácidos puede tener influencia en la síntesis de proteína ya que esta se estimula rápidamente en los tejidos después de haberla ingerido, Greiwe *et al.*, (2001) la infusión de leucina en periodos de 2 horas incrementa la fosforilación de proteínas que intervienen en la síntesis de proteína

2.6.1 EL PAPEL FUNDAMENTAL DE mTOR

En las etapas de síntesis de proteína, participan factores de traducción que son activados o desactivados por alteraciones moleculares y estructurales provocadas por su fosforilación, que son reguladas a su vez por el complejo mTOR. Este controla al menos tres tipos de componentes de la maquinaria de traducción.

- El primero son las proteínas ribosomales S6, componente del complejo de la subunidad ribosomal 40S y sus quinasas (S6Ks), las cuales son activadas por insulina mediante reacciones de fosforilación.
- El segundo componente, la señalización de mTOR provoca la fosforilación de la proteína ligadora 1 (4E-BP1) del factor eucariótico de iniciación (eIF4E) y su liberación del mismo (Hughes *et al.*, 1999), el que una vez liberado se asocia con

las proteínas eIF4G para formar el complejo de factores activos de la traducción (Browne y Proud, 2002),

- Tercer componente, mTOR controla las etapas de iniciación y elongación de la traducción (Wullschleger *et al.*, 2006).

2.6.2 AMINOÁCIDOS Y mTOR

La disponibilidad de aminoácidos a nivel celular regula la actividad de mTOR. Estudios en cultivos celulares de mamíferos se observa que disminuye también la tasa de síntesis de proteína (Gao *et al* 2002; Hara *et al* 1998; Kim *et al* 2002). Efecto que positivamente se modifica con la readición de AA (Fox *et al* 1998; Hara *et al* 1998). Lo que sugiere que los AA tienen un efecto muy marcado en la maquinaria de síntesis de proteína

Sin embargo de todos los aminoácidos adicionados, solamente el cambio en los niveles de leucina es suficiente para regular el estado de fosforilación y la actividad de la vía mTOR (Hara *et al* 1998; Lynch *et al* 2000). Varios trabajos en roedores y humanos donde han administrado la ingestión de aminoácidos esenciales y especialmente de Leucina, reportan un incremento en la síntesis de proteína en musculo esquelético a través de la activación de la vía mTOR

Pero, exactamente se desconoce cómo es que los aminoácidos regulan la vía de señalización mTOR. Por el momento se ha propuesto que los aminoácidos participan en la

vía mTOR de forma independiente-TSC1/TSC2 (Smith *et al* 2005) y TSC1/TSC2-dependiente (Gao *et al* 2002). Tomando en cuenta que son diversos elementos en esta vía de señalización de mTOR los aminoácidos podrían interactuar con otras quinasas

Algunos estudios sugieren que Rheb, juega un papel esencial en la regulación de la activación de mTOR. Este efecto es en respuesta a la presencia de los aminoácidos (Inoki 2003) además de la disminución en la concentración de estos nutrientes. Se observa que reduce la interacción entre Rheb y mTOR (Long *et al* 2005). Esta información hace suponer que la falta de los aminoácidos en el momento y cantidad necesaria puede detener la maquinaria de la síntesis de proteína

3 HIPÓTESIS

La adición de leucina a una dieta base trigo adicionada con los tres primeros aminoácidos limitantes en forma libre, puede afectar la expresión de genes para miosina y proteínas transportadoras de aminoácidos, y el comportamiento productivo en cerdos

4 OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Determinar el efecto de la adición de leucina a dietas base trigo adicionada con los tres primeros aminoácidos limitantes en forma libre en la expresión de genes para miosina y proteínas transportadoras de aminoácidos, y el comportamiento productivo en cerdos

4.2 ESPECÍFICOS

Evaluar el comportamiento productivo de cerdos en etapa de crecimiento alimentados con dietas base trigo y aminoácidos sintéticos comparados con una dieta típica

Determinar en cerdos de crecimiento la expresión de mRNA de los genes para miosina y proteínas transportadoras de aminoácidos alimentados con dietas base trigo y aminoácidos sintéticos comparados con una dieta típica

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Unidad Experimental Porcina en el área Fisiología y Metabolismo del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja

California. Esta área cuenta con corraletas de metal independientes por animal con bebedero automático y comedero de tolva, cuenta además con aire acondicionado para tener temperatura confort de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, el trabajo de campo tuvo una duración de 21 días iniciando el 1 al 21 de Agosto del 2009

5.1 ANIMALES

Se utilizaron 20 cerdos cruzados (Landrace x Hampshire x Duroc), con un peso vivo inicial de 14.9 ± 0.27 kg., distribuidos en cuatro tratamientos con base en su peso inicial, sexo, edad y camada. Estos animales se alojaron individualmente en corraletas 0.6 X 1.2 m. y tuvieron libre acceso al alimento y al agua de bebida todo el tiempo. Los animales se pesaron los días 0, 7, 14, 21, además, el consumo de alimento, la conversión alimenticia y la ganancia diaria de peso también se registró en estos días

5.2 DIETAS

Se realizaron 4 dietas diseñadas para ver el efecto del aminoácido leucina en la síntesis de proteína, la primera dieta base se realizo con solo trigo y adicionada con vitaminas y minerales pretendiendo así que fuera deficiente solo en Lisina, Treonina y Metionina que en las dietas base trigo son los primeros Aminoácidos Limitantes , la segunda dieta se le adiciono los aminoácidos limitantes en forma sintética a la dieta base y se agrego 0.36% Lis, 0.27% Tre, 0.21% Met, vitaminas y minerales en cantidades

suficientes para satisfacer los requerimientos para cerdos en crecimiento en el rango de 10 a 20 kg de peso vivo (NRC, 1998). La tercera dieta se formulo similar a la dieta 2 cubriendo los requerimientos y adicionándole el aminoácido L-Leucina y por ultimo una cuarta dieta a la cual se formulo con la combinación de trigo-pasta de soya utilizando el concepto de proteína ideal esta dieta testigo trigo-pasta de soya, cubriendo el requerimiento para cerdos de 10-20 kg. de 1.05% de lisina (NRC 1998).

Cuadro 3.- Composición de las dietas experimentales

Ingredientes (%)	Dietas ¹			
	Base	LTM	LTM+Leu	Testigo
Trigo	95.55	95.55	95.55	72.20
Pasta de soya				24.80
L-Lisina HCl		0.88	0.88	
L-Treonina		0.27	0.27	
DL-Metionina		0.1	0.1	
L-Leucina			0.80	
Almidón de maíz	2.05	0.80		
Carbonato de Ca	1.35	1.35	1.35	1.35
Ortofosfato	0.40	0.40	0.40	1.00
Sal iodada	0.35	0.35	0.35	0.35
Vitaminas y Minerales ²	0.20	0.20	0.20	0.20
Antibiótico	0.10	0.10	0.10	0.10
Análisis de los nutrientes, %				
Proteína Cruda	11.00	11.00	11.00	20.30
Lisina	0.36	1.05	1.05	1.05

¹ Base trigo con 0.36% Lis; LTM, dieta base más Lis, Tre y Met; LTM + Leu, como LTM más Leu; Testigo, dieta trigo pasta de soya, 1.05% Lis

² Proporcionó por kg de dieta: Vit. A, 17,500 IU; Vit. D, 200 IU; Vit. E, 11 IU; niacina, 12.5 mg; ácido pantoténico, 9 mg; folacina 0.3 mg, riboflavina, 3.0 mg; piridoxina, 1.5 mg; vit. K, 0.5 mg; biotina, 0.5 mg; vit. B₁₂, 15 mg; Zn, 80 mg; Cu, 5 mg; Fe, 80 mg; Mn, 3 mg; I, 0.14 mg; Se, 0.25 mg.

5.3 SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS

Después de los 21 días del experimento de campo los cerdos fueron sacrificados, se tomaron muestras aproximadamente 0.5 g de tejido que se colocaron en tubos de 2 ml previamente identificados, las partes del cerdo donde se tomo la muestra para los análisis de laboratorio fueron hígado (HIG), las tres porciones del intestino delgado (Duodeno, yeyuno e íleon) y de los músculos largo dorsal (LD) y semitendinoso (ST), los cuales se guardaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a - 85°C

5.4 ANÁLISIS DE LABORATORIO

Extracción del ARN total

La extracción del ARN, se realizó mediante la técnica de Trizol Reagent (Chomczynski and Sacchi, 1987). Se pulverizó aproximadamente 0.1 g de tejido en nitrógeno líquido, se agregó 1 ml de Trizol y se homogenizó, se prosiguió a centrifugar por 10 min a 10,000 rpm a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 2 ml dejando reposar en hielo por 5 minutos. Para después añadir 0.2 ml de cloroformo, se mezcló y se dejó reposar por 3 min. Después se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, la fase acuosa fue transferida a un tubo estéril de 2 ml añadiendo 0.5 ml isopropanol, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, enseguida se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C. Se removió el sobrenadante para recuperar la pastilla y se le agregó 1 ml de etanol (100%). Después, se centrifugó a 8,500 rpm a 4 °C, posteriormente se eliminó el

sobrenadante y se dejó secar la pastilla. La pastilla fue resuspendida con 35 μ l de agua DEPC, por último en una cámara de electroforesis (BIORAD) se corrió un gel de agarosa al 1.2% para verificar la integridad del ARN

Transcripción Reversa (RT)

En un microtubo de 500 μ l se colocaron 5 μ l de ARN, 6 μ l de buffer 5x, 0.75 μ l de DNAsa de 0.1 U/ μ l (Invitrogen), 18.25 μ l de agua tratada con DEPC (agua libre de DNAsa/ARNsa) en hielo, la reacción se incubó a temperatura ambiente 15 min y después 5 min a 70 °C en un heat-block, se agregó a la reacción 1 μ l de random primer con una concentración de 0.15 μ g/ml (Invitrogen), 1 μ l de DNTP's 10 μ M, se incubó a temperatura ambiente 5 min, después se volvió a colocar en hielo mientras se añadió 2 μ l de buffer 5x, 3 μ l de DTT 0.1 M, 1 μ l de inhibidor de ARNsa 10 U/ μ l, se homogenizó y centrifugó (10 seg). A continuación la reacción, se incubó a 42 °C 2 min, se añadió la enzima transcriptasa reversa 200 U/ μ l (RT-Superscript III, Invitrogen) y se procedió a incubar a 42 °C por 50 min y a 70°C durante 15 min, al finalizar la reacción el ADNc fue guardado a -20°C para posteriormente realizar PCR y QT-PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa en punto final

Para determinar la calidad de los RT's y se realizaron con oligos específicos para los genes en estudio (Cuadro 4), estas reacciones se prepararon adicionando a un microtubo de 0.2 ml, 1 μ l de MgCl, 1 μ l DNTP's 5 μ l buffer 5X, 1 μ l de oligo antisentido y 1 μ l de oligo

sentido, 0.5 µl de enzima ADN polimerasa y 3 µl de cDNA se colocaron en un termociclador

Cuadro 4.- Oligonucleótidos utilizados para PCR tiempo real

Gen	Fragmento Sentido	Fragmento Antisentido	Tamaño
CAT-1 (AY371320)	GTCGGTTGCAAAGACCATTT	GAGCGGTGCTGACAACAGTA	329 Kb
b^{0,+} (EF127857)	CGGAGAGAGGAUGAGAAGU	GCCCGCTGATGATGATGATGA	562 Kb
MIO (MN_001123141)	AGAUUUCUGACCUGACUG	TCTCCCTCCATCTTCTC	340 Kb
RIB (AY265350)	GGCCTACTAAACCATCCAA	TAGAGGGACAAGTGGCGTTC	295 Kb

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El cDNA producto de la técnica RT se cuantificó con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (Sambrook and Russell, 2001), para esta reacción se diseñaron oligonucleótidos para cada uno de los ARNms (cuadro oligos). Los mRNA en estudio son:

- Músculo largo dorsal y semitendinoso: Ribosomal 18S (Rib), Miosina (Mio), transportadores de aminoácidos (CAT1 y b^{0,+})
- Yeyuno: Rib, CAT1, y b^{0,+}
- Hígado: Rib, CAT1, b^{0,+}.

El equipo empleado para los análisis de PCR cuantitativo fue un Cromo 4 (Bio Rad) adaptado a un termociclador ADN Engine (Bio Rad) y el software utilizado para el análisis de resultados fue MJ Opticom Monitor, versión 3.1. La metodología a seguir fue en un espectrofotómetro se realizó la lectura a 260 nm para determinar la concentración de los

cDNA obtenidos mediante el procedimiento de retrotranscripción. Una vez determinado los valores de concentración obtenidos se realizaron diluciones de los cDNA para homogeneizarlos a una concentración de 50 ng de cDNA/ μ l.

Para las reacciones de PCR cuantitativo se emplearon 50 ng de ADNc; oligonucleótidos específicos; a una concentración final de 0.10 μ M de cada uno; se agregaron 12.5 μ l de SYBR Green Supermix (Maxima™ SYBR Green/Rox qPCR Master Mx 2X, fermentas), esta mezcla contiene a la enzima ADN polimerasa, un buffer con MgCl y SYBR-Green; la reacción fue completada para un volumen total de 25 μ l con agua libre de nucleasas tratada con DEPC. Las temperaturas de alineación para la amplificación de los fragmentos de los mRNA fueron de 56°C y se realizaron con 45 ciclos de amplificación.

Cada uno de las pruebas de PCR cuantitativo se agrupó los RNA mensajeros del mismo tejido y del mismo gen, así también un testigo que es un gen constitutivo que fue ribosomal 18S.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar los datos del experimento de comportamiento productivo se utilizo un diseño de bloques completos al azar (Steel y torrie 1988) y la razón de bloqueo fue peso inicial, el análisis de las medias fue con contrastes ortogonales

$$\text{Modelo: } Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable dependiente.

μ = Media poblacional.

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento.

β_j = Efecto del j -ésimo bloque.

ε_{ij} = Error experimental.

Supuestos del modelo: Los errores se distribuyen $\sim NI(0, \sigma^2)$.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La disponibilidad intracelular de AA catiónicos (Lys y Arg) es bien conocida para regular la tasa y la eficiencia de crecimiento animal a través de la regulación de síntesis de proteína., (Kim *et al* 2002). Esto es porque Lys es generalmente aceptado como el primer AA limitante en la mayoría de ingredientes para la alimentación de cerdos, mientras que Arg es limitante en cerdos neonatales (Wu *et al.*, 2004). Según Anthony *et al.* (2004), una deficiencia en uno o más de los AAs esenciales deprimen la síntesis de proteína en la etapa de iniciación en la traducción del mRNA. Así, hay que asegurar que todos los AAs sean suministrados en cantidades suficientes para el crecimiento potencial de los cerdos. También, es importante reconocer a los AAs que compiten entre ellos para la absorción de AA a nivel celular (Hagihira *et al.*, 1961), y que la toma de AAs neutros puede afectar la

absorción de AAs (Broer, 2008). Por consiguiente, el nivel en la dieta AAs neutros y catiónicos así como también la abundancia y la actividad de transportadores de AA se espera que afecte la disponibilidad de AA para síntesis de proteína.

6.1 COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO

Los resultados del comportamiento productivo se muestran en el Cuadro 5, La adición de Lis, Tre y Met a la dieta base incrementó ($P < 0.001$) la GDP, CA y CDA comparada con la dieta base. Este resultado era esperado debido a que la dieta base se formuló para que fuera deficiente en los tres primeros aminoácidos limitante, Lys, Tre y Met. Sin embargo, la inclusión adicional de Leu a la dieta base enriquecida con los tres aminoácidos limitantes redujo la GDP ($P = 0.001$) y CDA ($P = 0.007$), en comparación con lo observada en los cerdos que recibieron la misma dieta sin Leu; la CA no se afectó por la inclusión de Leu ($P = 0.734$). Se esperaba que la adición de Leu provocara un incremento significativo en GDP dado que existen diversos trabajos que señalan que la ingestión de leucina activaría la maquinaria reguladora de síntesis de proteína (Drummond et al 2008). La falta de efecto de Leu puede atribuirse a que la adición de Leu puede afectar la disponibilidad de Ile y Val debido a que estas eran marginales en la dieta base y a la competencia que existe entre los AA de cadena ramificada por el mismo sistema de absorción (Haghira *et al.*, 1961).

Estos resultados coinciden con Méndez *et al.*, (2009), quienes también observaron una reducción en la ganancia de peso al incrementar el nivel de leucina en dietas

elaboradas con base en trigo, suplementada con los tres primeros AA limitantes para cerdos en la misma etapa. En contraste, Suryawan, *et al.* (2008) Encontraron que al incrementar niveles de leucina en cerdos neonatos incrementaba la síntesis de proteína, pero, es importante hacer notar que a diferencia de Méndez, *et al.*, (2009), los primeros hicieron infusiones de leucina directamente en sangre de lechones de 7 días de edad alimentados con leche materna y bajo condiciones de manejo y alimentación distintas a las que ocurren en la práctica.

En los cerdos alimentados con la dieta base adicionada con Lis, Tre, Met comparada con la testigo no se observa una diferencia significativa tanto para GDP, CDA y CA. Esta respuesta coincide con la obtenida por Barrera *et al.* (2004), quienes concluyeron que en dietas formuladas con trigo se puede sustituir el 100% de la pasta de soya con Lis, Tre y Met libre

Cuadro 5.- Ganancia diaria de peso (GDP), consumo de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA) de cerdos en crecimiento alimentados con las dietas experimentales.

Item	Dietas ^a				E.E.	Contrastes ^b , <i>p</i> =		
	Base	+ LTM	+LTM+L	Testigo		C ₁	C ₂	C ₃
GDP, kg/d	0.25	0.80	0.64	0.73	0.026	< 0.001	< 0.001	0.094
CDA, kg/d	0.75	1.20	0.98	1.08	0.048	< 0.001	0.007	0.105
CA	3.02	1.51	1.55	1.49	0.083	< 0.001	0.733	0.835

^a Base, trigo, 11.0% PC, 0.36% Lis, 0.37% Tre, 0.21% Met; LTM, Base más 0.70% Lis, 0.27% Tre, and 0.10% Met; LTM+L, como en LTM más 0.80% Leu; Testigo, dieta trigo-pasta de soya con 1.05% Lis.

^b Contrastes: C₁, Base vs. LTM; C₂, LTM vs. LTM+L; C₃, LTM vs. Testigo.

6.2 EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNM PARA b^{0,+} Y CAT-1

En el cuadro 6 se presenta el resultado de la expresión del ARNm para el gen b^{0,+} en intestino delgado (yeyuno). Se observó el incremento (P = 0.019) en la expresión del gen por efecto de la adición de Lisina, Treonina y Metionina (LTM) a la dieta base. Además, se observa una reducción marcada (P = 0.031) en la expresión de este transportador por efecto de adicionar leucina a la dieta LMT. Asimismo, se observó un decremento (P = 0.006) en la expresión de b^{0,+} en los cerdos que recibieron la dieta, en comparación con los de la dieta base adicionada con LMT.

Cuadro 6.- Expresión del gen de la proteína transportadora de aminoácidos b^{0,+} en intestino delgado (Yeyuno)

	Dietas ^a					Contrastes ^b , p =		
	Base	+ LTM	+LTM+L	Testigo	E.E.	C ₁	C ₂	C ₃
b^{0,+}								
Yeyuno	4.50	20.79	6.06	0.49	6.02	0.019	0.031	0.006
CAT-1								
Yeyuno	0.2849	0.0072	0.0734	0.1887	0.0611	0.0007	0.2997	0.0117
MST ^c	0.0763	0.2671	0.3389	0.0139	0.1356	0.1848	0.6065	0.0865
MLD	0.0751	1.1531	0.3192	0.3997	0.1842	0.0001	0.0007	0.0015

^a Base, trigo, 11.0% PC, 0.36% Lis, 0.37% Tre, 0.21% Met; LTM, Base más 0.70% Lis, 0.27% Tre, and 0.10% Met; LTM+L, como en LTM más 0.80% Leu; Testigo, dieta trigo-pasta de soya con 1.05% Lis.

^b Contrastes: C₁, Base vs. LTM; C₂, LTM vs. LTM+L; C₃, LTM vs. Testigo.

^c Contrastes adicionales: C₁, Base vs. LTM+L (P = 0.077); C₂, LTM+L vs. Testigo (P = 0.034).

Los resultados indican que al adicionar a la dieta base, los tres primeros aminoácidos limitantes existe un incremento del 461% en el transportador $b^{0,*}$, en concordancia con Mourad (2009) quien observo que la cantidad de AA influye en la mayor absorción. Entonces, posiblemente la mayor cantidad de sustrato disponible en la dieta con aminoácidos sintéticos provoca la necesidad de mayor número de proteínas transportadoras a nivel intestinal

Por otra parte en los datos se observa un efecto negativo en la expresión de $b^{0,*}$ cuando se le adiciono leucina a la dieta LMT, Broer (2008) indica que la absorción de Lys en células epiteliales es fuertemente estimulada por Leu este transportador antiporte media la absorción de AA catiónicos acoplado con el flujo de AA neutros. Por tanto la proporción de Lys:Leu se vuelve critica cuando hay una reducción en el contenido proteico y la suplementación de Lys libre. Además, y de acuerdo con un estudio (Guay *et al* 2006) en el cual se observa que al reducir el porcentaje de proteína cruda en la dieta, la concentración de AA en plasma sanguíneo aumenta. Entonces la célula al no utilizar los AA circulantes, posiblemente la síntesis de transportadores de aminoácidos decrece

Al comparar la dieta LMT vs PC existe una marcada disminución en la expresión de este gen, estos datos concuerdan con los publicados por Dave *et al* (2004). Quien realizó un estudio en ratones y obtuvo una baja expresión en yeyuno, posiblemente por la baja disponibilidad de los sustratos en esa región. Aunque también, el efecto podría ser dado ya que el organismo de los seres vivos es extremadamente eficiente y al estar la mayoría

de los aminoácidos en exceso en la dieta no es necesario que se produzca gran cantidad transportadores para ingresar aminoácidos al torrente sanguíneo y así abastecer a la célula

En el cuadro 6 también se muestran los resultados de CAT-1 en MST y MLD. . La variación entre los valores de expresión de este transportador, dentro del tratamiento LTM fue extraordinariamente elevada, lo cual impidió realizar comparaciones útiles entre los efectos de éste con los del resto de los tratamientos. Por tanto, y sólo para este caso, se contrastó además el efecto de la dieta LTM+L contra los efectos individuales de las dietas base (LTM+L vs. Base) y testigo (LTM+L vs. Testigo). Así, la adición de Lis, Tre, Met y Leu a la dieta base incrementó ($P = 0.077$) la expresión de CAT-1; pero, cuando se comparó el efecto de la adición de los AA libres con el de la dieta testigo, la expresión de este transportador se redujo de manera sustancial ($P = 0.034$). Por otra parte, con respecto al MLD, se observa que la adición de LMT a la dieta base incrementa la expresión de CAT-1 ($P < 0.001$). Sin embargo, la inclusión adicional de leucina a la dieta base más LTM redujo su expresión ($P < 0.001$). Asimismo, la expresión de este gen fue menor en los cerdos que recibieron la dieta testigo, en comparación con los de la dieta LTM ($P = 0.002$).

La literatura indica que CAT-1 no es muy común en células epiteliales, pero la expresión podría estar ubicada en la parte basolateral de la membrana (Vekony *et al.*, 2001). Así que, en el presente estudio se aisló el RNAm de CAT-1. Por tanto, los resultados cuantitativos indican que la expresión del RNAm de CAT-1 aumenta significativamente en

la dieta deficiente de AA sintéticos en comparación con la dieta que provee cantidades suficientes en los mismos AA. En concordancia con Fernández *et al* (2002) quienes reportan que la expresión aumenta en condiciones de deficiencia de AA. También, Wilson y Webb, (1990) indican que este transportador tiene mayor afinidad con AA catiónicos es decir con Lys en células epiteliales en yeyuno e íleon. Entonces, el aumento en la expresión del gen podría deberse a la deficiencia de Lys en la dieta base

Asimismo, se observa un aumento en la expresión del gen CAT-1 en los cerdos con la dieta testigo, con respecto a la adicionada con LMT. Lo cual coincide con lo publicado por Liao *et al* (2008). Estos autores cuantificaron la expresión del mismo RNAm, y reportaron un aumento significativo en la expresión tanto por efecto de la etapa productiva y en la porción intestinal en ganado bovino y obtuvieron la mayor expresión en la etapa de crecimiento y yeyuno. Por tanto, el incremento en la expresión de este gen podría ser atribuido a diferencias en la etapa productiva y el tipo de dieta estudiadas

Por otra parte en MLD, se observa que al comparar la dieta LMT con PC hay una reducción en la expresión de este gen. En contraste, en un trabajo realizado con pollos (broilers), se reporta un incremento en la expresión de este gen en el musculo *pectoralis* (pechuga) cuando los animales fueron alimentados con una dieta típica (Humphrey *et al.* 2004); entonces, CAT-1 es el principal transportador en el cuerpo para Lisina, Arginina y Ornitina. Por tanto, estos datos posiblemente indican que la célula modifica su actividad

biosintética para incrementar la absorción de este AA, que es el primer limitante para el crecimiento y síntesis de proteína muscular en esas dietas para los pollos.

En este estudio la expresión de CAT-1 en yeyuno y MLD no se afectó por ningún AA adicionado. Pero, la adición de Lys y Leu afectaron diferente la expresión de CAT-1 en MST. No es muy claro como Lys reduce y Leu incrementa la expresión de este transportador, en general en este estudio los resultados obtenidos muestran la gran complejidad que existe en la absorción de los AA aminoácidos por las células. Aparentemente, ya que los AA de la dieta pasan por el hígado y su potencial para su desaminación en este u otros órganos podrían modificar la concentración de algunos AA, y esto podrían explicar parcialmente las diferencias en la expresión de los transportadores de AA tanto en intestino como en las células musculares

6.3 EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN MIOSINA

En el cuadro 7 se muestran los resultados de la expresión de miosina en músculo semitendinoso y largo dorsal. Respecto a MST hay un incremento ($P < 0.001$) al comparar la dieta base con la dieta LMT. Pero se observa una reducción ($P < 0.0001$) al adicionar leucina. También se observa una reducción ($P < 0.0001$) en la expresión al comparar la dieta LTM contra la dieta testigo. Por otra parte en el MLD no se observó efecto en la expresión de miosina debido a la adición de los primeros tres aminoácidos limitantes ($P = 0.860$) ni a la dieta testigo ($P = 0.843$). La adición de leucina a la dieta base con LTM incrementó ($P = 0.003$) la expresión de miosina. Sin embargo, cuando se comparó la

expresión de miosina en los cerdos que recibieron la dieta adicionada con LMT+Leu, con los de la dieta base y Testigo se observaron valores sustancialmente mayores ($P = 0.002$) en los primeros

Cuadro 7.- Expresión del gen de la proteína miosina (MYO) en musculo semitendinoso (MST) y musculo largo dorsal (MLD)

Item	Dietas ^a					Contrastes ^b , $p =$		
	Base	+ LTM	+LTM+L	Testigo	E.E.	C ₁	C ₂	C ₃
MST	2.9686	5.5208	0.0359	0.2924	0.555	0.0006	0.0001	0.0001
MLD ^c	0.086	0.662	12.431	0.016	3.2017	0.8602	0.0032	0.8433

^a Base, trigo, 11.0% PC, 0.36% Lis, 0.37% Tre, 0.21% Met; LTM, Base más 0.70% Lis, 0.27% Tre, and 0.10% Met; LTM+L, como en LTM más 0.80% Leu; Testigo, dieta trigo-pasta de soya con 1.05% Lis.

^b Contrastes: C₁, Base vs. LTM; C₂, LTM vs. LTM+L; C₃, LTM vs. Testigo.

^c Contrastes adicionales: C₁, Base vs. LTM+L ($P = 0.002$); C₂, LTM+L vs. Testigo ($P = 0.002$).

En los resultados del MST se observa un efecto positivo en la síntesis de proteína muscular al adicionar de Lys, Tre y Met. En este estudio la dieta base se formuló arbitrariamente que fuera deficiente en los primeros tres aminoácidos limitantes. Por lo tanto, era de esperarse una disminución en la síntesis del RNAm. En concordancia con Cervantes (2003) que señala cuando los cerdos se han alimentado con dietas base trigo, se ha logrado eliminar totalmente la pasta de soya en la dieta sin afectar su respuesta productiva a la de animales que reciben dietas con niveles superiores de proteína cruda. Entonces, podría ser que una disminución en la concentración de AA limitantes a nivel celular afecta negativamente la expresión del RNAm de miosina

También, los resultados indican que en musculo semitendinoso hay una reducción en la síntesis de proteína al adicionar leucina en la dieta base adicionada con Lys, Tre y Met, en contraste diversos trabajos (Sreekumaran y Short, 2005; Drummond *et al.*, 2008) reportan incremento en la síntesis de proteína, posiblemente esta diferencia se debe a que los estudios son realizados en humanos y ratas además de realizarse en condiciones diferentes al realizado en este experimento. Además, en la dieta con AA sintéticos Leu podría competir con valina o isoleucina por el transportador ya que comparten transportador por su estructura química semejante, lo que convertiría marginal a uno de estos AA

Además, en MST se observa en los resultados un decremento en la expresión de miosina en la dieta PC al compararla con LMT. Sin embargo, no existe diferencia en la ganancia diaria de peso. Un estudio reveló una mayor digestibilidad de AA en dietas base trigo obteniendo un consumo de lisina, metionina y treonina en trigo que fue de 42.9, 16.7 y 10.5% superior que en sorgo, y 11.1, 10.5 y 2.4% que en maíz (Araiza *et al* 2003), Entonces, la mayor síntesis de miosina podría deberse a que la célula absorbió del medio exterior una mayor concentración de AA limitantes en la dieta LMT debido a su mejor digestibilidad y por lo tanto pudo aumentar su utilización que los animales alimentados con una dieta típica

En lo que respecta a MLD los resultados indican un efecto positivo por la adición de leucina a la dieta LMT. En concordancia con diversos estudios (Anthony *et al* 2000; Lynch

2001), los cuales señalan que existe evidencia que leucina por si sola promueve la síntesis de proteína muscular a través de la vía mTOR. Aunque todavía no se sabe con exactitud el mecanismo por el cual leucina promueve la síntesis de proteína muscular en esta compleja vía de señalización. Aunque, se observó un efecto negativo en la GDP al adicionar Leu a la dieta LMT

7 CONCLUSION

Existe una disminución de un 26% en GDP con la adición de Leu a la dieta baja en PC adicionada con LMT+leucina, y a nivel celular con la expresión de los genes relacionados con la síntesis de proteína en las dietas adicionada con LMT+leucina. Esto se debe a que leucina interactuó con isoleucina y valina, ya que estos contienen una estructura química semejante y por lo tanto compiten por el transporte en el epitelio intestinal o para pasar la membrana celular, reduciendo así la síntesis de proteína.

8 LITERATURA CITADA

1. Alberts et al (2004). *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega. ISBN 54-282-1351-8.
2. Anthony JC, Gautsch T, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4f formation. *J Nutr* 2000; 130: 139-45
3. Araiza-Piña A., Miguel Cervantes-Ramírez, Aurelio Morales-Maldonado, Salvador Espinoza-Santana, Maximiliano Cervantes-Ramírez y Noemí Torrentera-Olivera DIGESTIBILIDAD ILEAL APARENTE DE AMINOÁCIDOS EN SORGO, MAÍZ Y TRIGO EN DIETAS PARA CERDOS EN CRECIMIENTO *Agrociencia* 37: 221-229. 2003
4. ARC, agricultural research council. *The nutrient requirements of pigs* slough UK commonwealth agricultural bureau 1981
5. Baker, D.H., and V. C. Speer 1983. Protein-amino acid nutrition of nonruminant with emphasis on the pigs: past, present and future, *J. Anim Sci.* 57(suppl 2): 284
6. Baker. D.H. and Han Y. *Ideal protein for chicks* 1998
7. Bannai, S. 1984a. Induction of cystine and glutamate transport activity in human fibroblasts by diethyl maleate and other electrophilic agents. *J. Biol. Chem.* 259:2435- 2440.
8. Barrera, M.A., M. Cervantes, W.C. Sauer, A. Araiza, N. Torrentera, and M. Cervantes. 2004. Ileal amino acid digestibility and performance of growing pigs fed wheat-based diets supplemented with xylanase. *J. Anim. Sci.* 82:1997-2003.

9. BLACK (1991) Feedstuffs, Junio 24
10. Blank (1986) Research and Development in Agriculture 3, 121-145.
11. Boisen, S. 1991. A model for feed evaluation based on in vitro digestible dry matter and protein. In: In Vitro Digestion for Pigs and Poultry (M.F. Fuller, editor). CAB International. Wallingford, p 135-145
12. Borja, E., y P. Medel, 1998. Avances en la alimentación del porcino. En: XIV Curso de Especialización FEDNA.
13. Broer, S. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88:249–286.
14. Cervantes Ramírez miguel / Víctor González Vizcarra / Salvador Rodríguez Rubí / Julio S González Monreal / Leopoldo Flores Aguirre 2000 CANULACIÓN DUODENAL E ILEAL PARA ESTUDIOS DE DIGESTIÓN EN CERDOS *Agrociencia*, Marzo / Abril, año/vol. 34, número 002 Colegio de Postgraduados Texcoco, México pp. 135-139
15. Cervantes RM, Cromwell GL, Knabe D (1997) Digestibilidad ileal de aminoácidos en dietas bajas en proteína, complementadas con aminoácidos en cerdos en crecimiento. *Agrociencia* 31: 149-155.
16. Cervantes-Ramírez Miguel, Pichardo Adrián, Manuel Cuca, José L. Figueroa, Alfonso B. Araiza, Noemí Torrentera and Maximiliano Cervantes 2003 Limiting amino acids in wheat for growing-finishing pigs *interciencia* vol 28 No. 5
17. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.

18. Christensen, H.N. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev.* 70:43-77.
19. COFFEY, M.T. (1996) En: *Nutrient Management of Food Animals to Enhance and Protect the Environment.* (E.T. Kornegay, ed.). Lewis Publishers. Pp. 29-39.
20. Dierick N, Vervaeke I, van der Hayden, Henderickx HK. Correlation of ileal and fecal digested protein and organic matter to production performance of growing pigs. In: Rostock (DDR) proc V Int symp protein metabolism and nutrition 1988; (1st): 50-51
21. Dritz S.S., M.D. Tokach, R.D. Goodband, y J.L. Nelssen. 1997. *General Nutrition Principles for Swine, MF2298.* Una serie de seis. Kansas State University .
22. Drummond, M.J., H.C. Dreyer, B. Pennings, C.S. Fry, S. Dhanani, E.L. Dillon, M. Sheffield-Moore, E. Volpi and B.B. Rasmussen. 2008. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J Appl. Physiol.* 104: 1452–1461.
23. FAN M.Z. S. W. Kim, T. J. Applegate, and M. Cervantes 2008 Nonruminant Nutrition symposium: Understanding protein synthesis and degradation and their pathway regulations *J. Anim. Sci.* 2008. 86(E. Suppl.):E1–E2 doi:10.2527/jas.2007-0731
24. FERKET, P.R. et al. (2002) *J. Anim. Sci.* 80 (E. Suppl. 2):E168–E182.
25. Fox HL, Kimball SR, Jefferson LS, Lynch CJ. Amino acids stimulate phosphorylation of p70s6k and organization of rat adipocytes into multicellular clusters. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C206–C213, 1998.

26. Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D. Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol* 4: 699–704, 2002.
27. Gasol E. 2004. Transportador de aminoácidos heteromérico xct Identificación, caracterización funcional y topología. Departament de Bioquímica y Biologia Molecular Facultat de Biologia Universitat de Barcelona
28. Greiwe, J. S., G. Kwon, M. L. Mcdaniel, C. F. Semenkovich. 2001. Leucine and insulin activate p70s6 kinase through different pathways in human skeletal muscle. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281: E466-71
29. Guay, F., S. M. Donovan, and N. L. Trottier. 2006. Biochemical and morphological developments are partially impaired in intestinal mucosa from growing pigs fed reduced-protein diets supplemented with crystalline amino acids. *J. Anim. Sci.* 84:1749-1760
30. Hansen, J. A., D. A. Knabe, and K. G. Burgoon. 1993. Amino acid supplementation of low-protein sorghum-soybean meal diets for 5-to 20- kilogram swine. *J. Anim. Sci.* 71: 452-458.
31. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mtor regulate p70 S6 kinase and eif-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* 273: 14484– 14494, 1998.
32. Hayashi, A. A. And C. G. Proud. 2007. The rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mtor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1647–E1655.

33. Hughes, J. M. X., M. Ptushkina, Md. M. Karim, N. Koloteva, T. Haar, and J. E. G. Mccarthy. 1999. Translational Repression by Human 4E-BP1 in Yeast Specifically Requires Human eif4e as Target. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 274, No. 6, pp. 3261–3264.
34. Humphrey Brooke D., Charles B. Stephensenb, Chris C. Calvert, Kirk C. Klasing 2004 Glucose and cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*) *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 138 (2004) 515–525
35. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb gtpase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mtor signaling. *Genes Dev* 17: 1829–1834, 2003.
36. Katz R. S., D. H. Baker, C. E. Sasse 1 , A. H. Jensen and B. G. Harmon. EFFICACY OF SUPPLEMENTAL LYSINE, METHIONINE AND ROLLED OATS FOR WEANLING PIGS FED A LOW-PROTEIN CORN-SOYBEAN MEAL DIET *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE*, vol. 37, no. 5, 1973
37. Kerr, B. J., F. K. Mckeith, and R. A. Easter. 1995. Effect on performance and carcass characteristics of nursery to finisher pigs fed reduced crude protein, amino acid-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 73:433–440
38. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument- Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Mtor interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110: 163–175, 2002.

39. Kimball, S. R., L. S. Jefferson. 2004. Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 313:423-7.
40. Le Bellego, L., J. Van Milgen, S. Dubois, and J. Noblet. 2001. Energy utilization of low-protein diets in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 79: 1259-1271
41. Lewis AJ (2001) Amino acids in swine nutrition. In Lewis A, Southern JL (Eds.) *Swine Nutrition*. 2nd ed. CRC Press. New York, USA. Pp. 151-186
42. Liao S. F., E. S. Vanzant, D. L. Harmon, K. R. Mcleod, J. A. Boling, and J. C. Matthews 2009 Ruminal and abomasal starch hydrolysate infusions selectively decrease the expression of cationic amino acid transporter mRNA by small intestinal epithelia of forage-fed beef steers *J. Dairy Sci.* 92:1124–1135
43. Liao S. F., E. S. Vanzant, J. A. Boling and J. C. Matthews 2008 Identification and expression pattern of cationic amino acid transporter-1 mRNA in small intestinal epithelia of Angus steers at four production stages *J Anim Sci* 2008.86:620-631
44. Lin F. D., D. A. Knabe, and T. D. Tanksley, Jr. 1987. Apparent digestibility of amino acids, gross energy and starch in corn, sorghum, wheat, barley, oat groats and wheat middlings for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 64: 1655-1663
45. Lodish et al. (2005). *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana. ISBN 950-06-1974-3.
46. Long X, Ortiz-Vega S, Lin Y, Avruch J. Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J Biol Chem* 280: 23433–23436, 2005.

47. Lynch CJ, Fox HL, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Regulation of amino acid-sensitive TOR signaling by leucine analogues in adipocytes. *J Cell Biochem* 77: 234–251, 2000.
48. Lynch CJ. Role of leucina in regulation of mtor by aminoacids: revelations from structure-activity studies *J nutr* 2001; 131:S861-5
49. Meade, R. J., J. T. Typpo, M. E. Tumbleson, J. H. Gochl and Helmut von ser Mehden. 1965. Effects of protein source and level, and lysine and methionine supplementation on rate and efficiency of gain of pigs weaned at an early age. *J. Anita. Sci.* 24:626.
50. Méndez, V. H. García, M. Cervantes, A. Morales, K. Minero, A.B. Araiza, M. Barrera, P. Carrillo y D. Pérez. 2009. Adición de leucina e isoleucina a dietas a base trigo enriquecidas con aminoácidos limitantes para cerdos en crecimiento. XXXVII
51. Miyazaki, M. And K. A. Esser. 2009. Regulation of Protein Metabolism in Exercise and Recovery Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol* 106: 1367–1373.
52. Mourad F. H., Kassem A. Barada, Carmen Khoury, Tamim Hamdi, Nayef E. Saade', and Camille F. Nassar 2009 Amino acids in the rat intestinal lumen regulate their own absorption from a distant intestinal site *J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G292–G298, 2009
53. NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th ed. Natl. Acad. Press. Washington, DC.

54. Palacín, M., R. Estévez, J. Bertran, and A. Zorzano. 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev.* 78:969-1054.
55. SAGARPA 1998. "Situación actual y perspectivas de la producción de carne de porcino en México 1990-1998"
56. Sambrook J. And Russell D. W. 2001b. *Molecular cloning a laboratory manual*. Third edition. Vol 2. Ed. Cold spring harbor laboratory press, cold harbor, New York.
57. Sauer WC, Just A, Jorgensen HN, Fekadu M, Eggum BO. The influence of diet composition on apparent digestibility of crude protein and amino acids at the terminal ileum and overall in pigs. *Acta Agric Scand* 1980; (30): 449-459
58. Sauer, W. C., J. J. Kennelly, F. X. Aherne, and R. M. Cichon. 1981. Availabilities of amino acids in barley and wheat for growing pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 61:793-802.
59. SCHUTTE, J.B., DE JONG, J. Y VAN KEMPEN, G.J.M. (1993) En: *Nitrogen flow in pig production and environmental consequences* (Verstegen, M.W.A., L.A. den Hartog, G.J.M. van Kempen y J.H.M. Metz, eds.). Pudoc Scientific Publishers Wageningen. Pp:259-263
60. Shelton, D.C., W. M. Beeson and E.T. Mertz 1950. Growth of weanling pigs on a diet containing ten purified amino acids
61. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de cerdo en México 2009, SAGARPA 2009
62. Smith EM, Finn SG, Tee AR, Browne GJ, Proud CG. The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J Biol Chem* 280: 18717–18727, 2005.

63. Sreekumaran, K.N. and K. R. Short. 2005. Hormonal and Signaling Role of Branched-Chain Amino Acids. *J. Nutr.* 135:1547S–1552S.
64. Steel, R. Y J. Torrie. (1988). *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2da edición. México: mcgrawhill.
65. Stein H. H., B. Sève, M. F. Fuller, P. J. Moughan and C. F. M. De Lange. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application *J Anim Sci* 2007. 85:172-180.
66. Suryawan A., A. S. Jeyapalan, R. A. Orellana, F. A. Wilson, H. V. Nguyen, and Teresa A. Davis. 2008. Leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs by enhancing mtorc1 activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E868–E875.
67. Trujillo-Coutiño Josué E., José L. Figueroa-Velasco¹, Manuel Martínez-Aispuro¹, Vicente Zamora-Zamora¹, José L. Cordero-Mora¹, Ma. Teresa Sánchez-Torres¹, Manuel Cuca-García¹ y Miguel Cervantes-Ramírez 2007 CONCENTRACIÓN DE UREA EN PLASMA Y RESPUESTA PRODUCTIVA DE CERDOS EN INICIACIÓN ALIMENTADOS CON DIETAS SORGO-PASTA DE SOYA BAJAS EN PROTEÍNA *Agrociencia* 41: 597-607
68. Tuitoek, J. K., J. C. Young C.F., M de Lange, and B.J. Kerr 1997. Body composition and protein and fat accretion in various body components in growing gilts fed diets with different protein levels but estimated to contain similar levels of ideal protein *J. Anim Sci.* 75: 1584-1590
69. Wang X. And C. G. Proud. 2006. The mtor Pathway in the Control of Protein Synthesis. *Physiology*, Vol. 21, No. 5, 362-369.

70. Whittemore CT, Green DM, Knap PW. - 2001- Technical review of the energy and protein requirements of growing pigs: protein, *Animal Science*, 73, 363-373
71. Wilson, J. W., and K. E. Webb Jr. 1990. Lysine and methionine transport by bovine jejunal and ileal brush border membrane vesicles. *J. Anim. Sci.* 68:504–514.
72. Wullschleger S., R. Loewith, M. N. Hall. 2006. Mtor signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.
73. Mathews C.k. Editorial: Prentice Hall Tema: Química Año Edición: 2003 N° de Edición: 3ª edición