

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS



**“Dietas bajas en proteína y aminoácidos de cadena ramificada
en expresión de transportadores de aminoácidos, concentración
sérica de aminoácidos y comportamiento productivo de cerdos
en crecimiento”**

**Trabajo presentado como requisito para obtener el grado de doctor en ciencias
agropecuarias**

PRESENTA

José Héctor García Villalobos

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Miguel Cervantes Ramírez

Mexicali Baja California Septiembre 2014

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo y facilidades durante mis estudios de posgrado.

Al instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, por aceptarme y permitirme estar en el programa de doctorado.

Al Dr. John Htoo por su ayuda en el diseño de los trabajos experimentales y Evonik Industries AG por el financiamiento de los mismos.

Al Dr. Miguel Cervantes Ramírez, por su apoyo, amistad y motivarme en los momentos más difíciles; así como en la dirección de los trabajos de investigación, compartir enseñanzas y experiencias.

A la Dra. Adriana Morales Trejo, por tener la paciencia para encaminarme en la investigación, por todas las horas invertidas en el laboratorio de biología molecular y su aporte de experiencias y sugerencias para ser una mejor persona.

Al Dr. Benedicto Alfonso Araiza Piña y Dra. Sawako Oshima, que con el ejemplo me enseñaron a dar el 100% en el trabajo y ser una persona responsable.

Al Dr. Jorge Luis Yáñez Hernández, por su amistad, las palabras de ánimo e inculcar un constante crecimiento personal y profesional.

Al Dr. Ruud T. Zijlstra por recibirme en la Universidad de Alberta y permitirme estar en su grupo de trabajo y tener la experiencia de vida que fue trabajar a su lado.

A todos mis amigos y compañeros del Cuerpo Académico de Nutrición Animal (CANA), por su amistad, enseñanzas y recuerdos memorables.

A Sandra Rojas Carranza por solucionar todas las dudas, tramites y facilitar todos los procesos en UABC; pero sobre todo por el trato tan humano que siempre tiene.

La presente tesis titulada “**DIETAS BAJAS EN PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA EN EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS, CONCENTRACIÓN SÉRICA DE AMINOÁCIDOS Y COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE CERDOS EN CRECIMIENTO**”, realizada por C. José Héctor García Villalobos; bajo la dirección del Dr. Miguel Cervantes Ramírez, siendo aceptada, revisada y aprobada, por el Consejo Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Consejo Particular

DIRECTOR DE TESIS

DR. MIGUEL CERVANTES RAMÍREZ

CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

SINODAL

DR. BENEDICTO ALFONSO ARAIZA PIÑA

SINODAL

DRA. SAWAKO OSHIMA

SINODAL

DR. JORGE LUIS YAÑEZ HERNÁNDEZ

“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”

INDICE GENERAL

	Pág.
Agradecimientos.....	2
Dedicatoria.....	3
Índice.....	5
Índice de cuadros.....	6
Índice de figuras.....	7
Lista de abreviaciones.....	8
Generalidades.....	9
I Expresión de genes, concentración sérica de aminoácidos y comportamiento de cerdos alimentados con diferentes relaciones leucina: lisina en la dieta.....	12
1.1 Resumen.....	12
1.2 Introducción.....	13
1.3 Materiales y métodos.....	15
1.3.1 Alojamiento y animales.....	15
1.3.2 Dietas.....	15
1.3.3 Recolección de tejidos.....	18
1.3.4 Purificación y extracción ARN total.....	19
1.3.5 Transcripción inversa.....	20
1.3.6 PCR en tiempo real.....	20
1.3.7 Análisis estadístico.....	22
1.4 Resultados.....	23
1.5 Discusión.....	26
1.6 Conclusión.....	35
1.7 Literatura citada.....	35
II Efecto de la suplementación de valina en dietas base trigo con exceso de Leucina en comportamiento productivo, expresión génica y concentración de aminoácidos en suero de cerdos en crecimiento.....	41
2.1 Resumen.....	41
2.2 Introducción.....	42
2.3 Materiales y métodos.....	43
2.4 Resultados y discusión.....	44
2.5 Conclusión.....	45
2.6 Literatura citada.....	48
III Conclusiones generales.....	50
IV Literatura citada.....	51

INDICE DE CUADROS	Pág.
Cuadro 1. Formulación de dietas baja en proteína suplementada con AA y alta en proteína (Base húmeda).....	17
Cuadro 2. Análisis del contenido de proteína cruda y aminoácidos, energía metabolizable calculada en dietas bajas en proteína suplementadas con AA y alta en proteína (Base húmeda).....	18
Cuadro 3. Cebadores de transportadores de aminoácidos $b^{0,+}$, CAT-1, miosina y 18s Ribosomal RNA usados para análisis qPCR al ADNc.....	22
Cuadro 4. Comportamiento productivo de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AA y altas en proteína.....	25
Cuadro 5. características de la canal de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionada con AA y alta en proteína.....	26
Cuadro 6. Expresión de $b^{0,+}$ y CAT-1 en dos segmentos del intestino delgado (yeyuno e íleon), hígado, músculo Longissimus dorsi y semitendinosus, y miosina en estos músculos de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionada con AA y alta en proteína.....	28
Cuadro 7. Composición de las dietas experimentales.....	44
Cuadro 8.- Comportamiento productivo, y expresión génica de $b^{0,+}$ (unidades arbitrarias: Relación de ARNm con ARN de subunidad ribosomal18) de cerdos alimentados por pareja con dieta alta en Leucina y dos niveles de suplementación de Valina.....	46
Cuadro 9.- Concentración sérica (mg/100 mL) de aminoácidos en cerdos alimentados por pareja con dieta alta en Leucina y dos niveles de suplementación de Valina.....	47

INDICE DE FIGURAS	Pág.
Figura 1. Inflexión ajustada con dos pendientes lineales para GDP en función a relaciones Leu: Lis DIE en cerdos de 25 a 45 kg.	30
Figura 2. Inflexión ajustada con dos pendientes lineales para CA en función a relaciones Leu: Lis DIE en cerdos de 25 a 45 kg.	31

Lista de abreviaciones

AA.- Aminoácidos

ADNc.- Acido desoxirribonucleico complementario

AP.- Alta en proteína

ARN.- Ácido ribonucleico

ARNm.- Ácido ribonucleico mensajero

ARNr.- Ácido ribonucleico ribosomal

b^{0,+}.- Transportador de aminoácidos catiónicos independiente de sodio

BP-AA.- Baja en proteína suplementada con aminoácidos cristalinos

CAT-1.- Transportador de aminoácidos catiónicos-1

CDA.- Consumo diario de alimento

EE.- Error estándar

EEM.- Error estándar de la media

EM.- Energía metabolizable

GDP.- Ganancia diaria de peso

MLD.- Músculo Longissimus dorsi

MST.- Músculo Semitendinosus

Na.- Sodio

pb.- pares de bases

PC.- Proteína cruda

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR.- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo

Generalidades

La alimentación representa en promedio 75% del costo total de producción el ganado porcino. Recientemente, este costo se ha incrementado aún más por la competencia en el uso de sus insumos para la producción de fuentes energéticas renovable como biodiesel, así como también para el consumo humano. Esto provoca un aumento en el precio de ingredientes que son normalmente empleados en las dietas para cerdos. Las dietas típicas para cerdos se componen de la combinación de cereal y pasta de soya, las cuales en la práctica son formuladas bajo dos objetivos. El primero, que contengan la cantidad adecuada de proteína cruda según los requerimientos nutrimentales para el máximo crecimiento por etapa productiva (NRC 2012), el segundo objetivo es cubrir las necesidades del primer aminoácido limitante que es Lisina. Sin embargo, es común que se provoque un desequilibrio debido a la composición de aminoácidos (AA) de esos ingredientes, y en consecuencia, se exceda el contenido de todos los demás AA en la dieta (Cervantes et al., 2009; Lewis, 2001).

Un alimento balanceado debe cubrir los requerimientos energéticos, de minerales y vitaminas, pero además las cantidades adecuadas de los AA que son necesarios para el crecimiento óptimo del animal; obteniendo así la mayor eficiencia productiva. En consecuencia, este tipo de dietas también contribuyen a reducir el impacto negativo de la producción en la contaminación ambiental, mediante una reducción en la excreción de nitrógeno derivado de dietas cuyo balance de aminoácidos no es el adecuado. La estrategia para conseguir ambos propósitos consiste en diseñar programas de alimentación con dietas que provean los nutrientes que el animal necesita pero sin excesos, es decir, con el balance óptimo de AA, resultando en una mejor utilización de los recursos y en la rentabilidad de

la explotación porcícola. Para lograr el objetivo se pueden formular dietas bajas en proteína, suplementadas con AA libres (AAL). Los AA libres o cristalinos se pueden emplear en las dietas para cerdos gracias a que ya están disponibles en el mercado a precios competitivos, y a que no afectan el comportamiento productivo de los cerdos al compararla con dietas típicas (Barrera et al., 2004).

Utilizando estas alternativas de alimentación se puede reducir la proteína cruda hasta en un 11.1% suplementadas con AAL como lisina (Lis), treonina (Tre) y metionina (Met). Esta alternativa disminuye significativamente la inclusión de ingredientes proteicos típicos, como la pasta de soya, en la formulación de dietas. Esto permite implementar dietas para cerdos con un perfil adecuado de AA, lo cual es determinante para la producción; ya que además de ser unidades de construcción de proteínas (Sreekumaran y Short, 2005), se le reconocen varias funciones metabólicas (Fan et al 2008) neuromediador (Le Floc'h et al 2011), precursor de óxido nítrico (Wu et al., 2009), histamina (Noor et al., 2010) así como también una participación en la activación de la síntesis de proteína global (Davis et al., 2008).

Los AA de cadena ramificada, leucina (Leu), isoleucina (Iso) y valina (Val), han demostrado tener la capacidad de estimular la síntesis de proteína (Fox et al. 1998; Anthony et al. 2000). De estos tres AA, Leu es el que ha demostrado una mayor capacidad para estimular de la síntesis de proteína en ratas (Anthony et al. 2000), y otras especies (CITA). Otros trabajos también señalan la participación de este AA para regular el mecanismo de síntesis de proteína corporal global (Han et al 2012).

Sin embargo las tasas de absorción de cada AA en plasma son asociados con el nivel de su inclusión de AA sintéticos a las dietas bajas en proteína (disponibilidad), pudiendo tener un desbalance en las concentraciones optimas y dando como resultado una reducción en la utilización de AA por el organismo, particularmente por el tejido muscular (Guay y Trotter, 2006). Desafortunadamente, existe información muy limitada sobre las relaciones y cantidades adecuadas de los AA en las dietas para cerdos en crecimiento.

Por lo antes mencionado, es necesario el conocer el efecto que tendrán las dietas que se le proporcionan a los animales, no solo a nivel de campo, sino también utilizar las herramientas con las que se cuenta para conocer que sucede a nivel celular y de esta manera mejorar la producción. No existen reportes a nivel molecular que muestren que el efecto de los aminoácidos asociados con la activación de la maquinaria de síntesis de proteína por dietas base-trigo adicionadas con los principales aminoácidos esenciales en forma libre. En este documento se presentan resultados de dos estudios en los que se evaluó el efecto de adicionar aminoácidos en forma libre en la dieta en el comportamiento productivo, concentración sérica y la expresión de algunos genes relacionados con la absorción de nutrientes y la síntesis de proteína en cerdos.

Capítulo I.

Expresión de genes, concentración sérica de aminoácidos y comportamiento de cerdos alimentados con diferentes relaciones leucina: lisina en la dieta.

1.1 Resumen: Se realizó un experimento con 96 cerdos (28.1 ± 0.83 kg peso corporal inicial) para analizar el efecto de la relación Leu: Lis de la dieta en la expresión de transportadores de aminoácidos (AA) $b^{0,+}$ and CAT-1 en yeyuno, hígado y dos músculos, miosina en músculos, y para estimar la relación óptima de Leu: Lis digestible íleal estandarizada (DIE) para velocidad y eficiencia de crecimiento. Cada tratamiento tenía ocho repeticiones. Se formuló una dieta con trigo y salvado de trigo para cubrir los requerimientos de AA DIE, excepto por Leu (0.70%) y Lis (0.80%). L-Leu se adicionó a la dieta base para crear 5 relaciones de Leu: Lis DIE (88, 100, 120, 140 y 160% en dietas 1 a 5). Se colectaron muestras de tejido de ocho cerdos tomados de los tratamientos 88, 120 and 160% Leu: Lis DIE para analizar la expresión relativa de $b^{0,+}$, CAT-1, y miosina. La expresión de $b^{0,+}$ en yeyuno fue mayor, pero en hígado fue menor en cerdos con la relación 120%, que aquellos con las relaciones 88 o 160%; la expresión de miosina en MLD también fue superior en cerdos del 120% ($P < 0.05$). CAT-1 fue inferior en yeyuno y *Longissimus* de cerdos con las relaciones 120 ó 160% que en cerdos del grupo 88%. La concentración sérica de la mayoría de AA disminuyó con el exceso de Leu en la dieta ($P < 0.05$). La DIE Leu: Lis de 104 y 109% optimiza la ganancia de peso y la conversión alimenticia, respectivamente. Estos resultados muestran que la relación Leu: Lis afecta la expresión de genes que codifican los transportadores de AA y miosina, la disponibilidad de Lis y la tasa y eficiencia de crecimiento en cerdos.

Palabras claves: Cerdos; Relación Leu: Lis; Expresión de genes; Aminoácidos en suero

1.2 Introducción

Leucina (Leu) es considerado como un aminoácido (AA) funcional debido a que estimula la síntesis de proteína en músculo esquelético mediante la activación del blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR) y el incremento en la tasa de traducción de ARNm para proteínas globales (Anthony et al., 2000). Leu estimula de manera aguda la síntesis de proteína mediante el control de la activación de mTOR y los componentes del inicio de la traducción en cerditos ayunados (Suryawan et al., 2011), pero solamente cuando los demás AA se proveen en cantidades suficientes para mantener niveles de aminocidemia apropiada (Wilson et al., 2010). Leu también está involucrado en el mecanismo de absorción de AA catiónicos (Bröer, 2008), lo cual puede afectar la disponibilidad de lisina (Lis) para la síntesis de proteína. Lis se transporta a través de la membrana apical y basolateral del enterocito mediante los transportadores $b^{0,+}$ y CAT-1, respectivamente (Majumder et al., 2009). El sistema $b^{0,+}$, el cual intercambia Leu por Lis (Torras-Llort et al., 2001) es el transportador más importante de Lis en el intestino delgado por lo que la absorción de Lis por $b^{0,+}$ está acoplada a la salida de Leu del enterocito (Pineda et al., 2004). Pero un exceso en el nivel de Leu en la dieta parece reducir la disponibilidad de Lis al disminuir la expresión del transportador $b^{0,+}$ (García-Villalobos et al., 2012). Estos reportes muestran que a) Leu estimula la síntesis de proteína muscular en cerdos, b) esta estimulación es dependiente de la disponibilidad de AA, pero c) el exceso de Leu puede afectar la absorción de Lis. Debido a que las dietas típicas para cerdos formuladas para cubrir el requerimiento de Lis (primer limitante) contienen excesos de Leu, la relación de Leu: Lis en la dietas es uno de los aspectos más críticos en su alimentación. La literatura publicada relacionada con la relación óptima de Leu: Lis DIE para cerdos es limitada, aunque relaciones con base

en valores de digestibilidad verdadera de 100% (Chung and Baker, 1992; Augspurger and Baker, 2004) a 110 % (Wang and Fuller, 1989) son reportadas como adecuadas para cerdos de 10- y 20-30 kg, respectivamente, usando variables de comportamiento y balance de nitrógeno como indicadores. Estos valores se determinaron antes de que se identificara la interacción entre Lis y Leu por la absorción de Lis, además del efecto de Leu en el control de la síntesis de proteína muscular. El entendimiento del mecanismo por el cual la relación Leu: Lis afecta la disponibilidad de AA puede contribuir a evitar potenciales interacciones negativas entre ambos AA y a mejorar la síntesis de proteína muscular. Nosotros especulamos que la relación Leu: Lis afecta la disponibilidad de AA y la síntesis de proteína muscular, la cual puede afectar a su vez la tasa y eficiencia del crecimiento de cerdos, pero la información disponible relacionada con este aspecto es aún limitada. Lisina, treonina, metionina, triptófano y valina se encuentra actualmente disponibles en forma cristalina (libre) y pueden incluirse en las dietas para eliminar excesos de algunos AA como Leu cuando solo se utiliza un cereal y pasta de soya en la dieta. Debido a que miosina es la proteína muscular más abundante (Czerwinski and Martin, 1994), su expresión puede usarse como indicador de la síntesis de proteína en cerdos. El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de diferentes relaciones Leu: Lis en la expresión de transportadores de AA catiónicos AA b^{0,+} y CAT-1 en yeyuno, hígado, los músculos *Longissimus* (LD) y *Semitendinosus* (ST), la expresión de miosina en LD y ST, y la concentración sérica (CS) de AA como indicador de la disponibilidad de AA. Además, se estimó la relación óptima de Leu: Lis DIE para maximizar la tasa de crecimiento y eficiencia alimenticia de cerdos en crecimiento.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Animales y alojamiento

Los cerdos se manejaron siguiendo las especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999,2001). Se utilizaron 96 cerdos cruzados (Landrace x Duroc; 28.1 ± 0.83 kg de peso inicial) distribuidos al azar en cuatro tratamientos con base en peso inicial, sexo, y camada, con seis repeticiones cada uno. El experimento se condujo en dos periodos. En cada periodo hubo dos cerdos por corraleta (un macho y una hembra) y cuatro repeticiones por tratamiento. Estos se alojaron en corraletas elevadas con piso de malla metálica (1.2 m ancho, 1.2 m largo) equipadas con comederos automáticos de acero inoxidable y bebederos de tipo chupón. Los cerdos se asignaron al azar a una de las dietas cuidando que no hubiera cerdos de la misma camada en un mismo tratamiento. El alimento y agua se ofrecieron a libre acceso. Los cerdos se pesaron cada 7 días para calcular la ganancia diaria de peso (GDP). El consumo de alimento (CDA) y la conversión alimenticia (CA) también se midieron con esa frecuencia. El peso vivo promedio de los cerdos al final del experimento fue de 41.6 ± 0.95 kg.

1.3.2 Dietas

Se formularon cinco dietas experimentales (Cuadro 1) con base en trigo y gluten de maíz usando el contenido analizado de AA y los coeficientes publicados de DIE (AminoDat® 4.0) para cubrir los requerimientos de AA de cerdos en crecimiento, excepto por Leu y Lis (NRC, 1998) complementadas con AA libres, vitaminas y minerales. Los tratamientos 1 a 5 fueron las dietas con las relaciones de Leu: Lis DIE siguientes: 88, 100, 120, 140, y 160%. Estas relaciones se obtuvieron mediante la adición de diferentes niveles

de gluten de maíz and Leu libre a las dietas. El gluten de maíz contiene hasta 10-veces más Leu que el trigo; a su vez, el trigo es uno de los pocos ingredientes cuyo contenido de Leu es inferior al requerimiento de cerdos en crecimiento. El contenido de Lis en la dieta se ajustó a 0.80% DIE, el cual corresponde aproximadamente a 92% del requerimiento de Lis para el genotipo de los cerdos empleados en este estudio (NRC, 1998). Por tanto, Leu fue el primer AA limitante y Lis fue el segundo en la dieta base para evitar sub-estimación de la relación Leu: Lis. Se adicionó metionina, treonina, triptófano, isoleucina, valina, fenilalanina e histidina a todas las dietas para exceder (7%) la relación de cada AA con respecto a Lis (0.85% con base en DIE). Se evitaron excesos de isoleucina y valina, pero se incluyeron niveles suficientes de estos AA en forma libre para eliminar cualquier efecto potencial de la interacción entre estos AA y Leu. El contenido de energía neta (EN) fue similar entre las dietas (Cuadro 2). El contenido de aminoácidos en los ingredientes alimenticios, dietas y suero se analizó por Evonik Industries (Hanau-Wolfgang, Germany; Llames and Fontaine, 1994).

1.3.3 Recolección de tejidos

Cuatro cerdos de cada uno de los tratamientos 1, 3, y 5 (relaciones Leu: Lis, 88, 120, 160%) se ayunaron durante la noche por 9 horas al final del estudio; posteriormente, a cada cerdo se le permitió consumir 650 g de alimento. Enseguida, 2.5 horas después de esta alimentación, los cerdos se sacrificaron previo aturdimiento con descarga eléctrica y se desangraron para colectar muestras de mucosa de intestino delgado (yeyuno), hígado y los músculos LD y ST. Las muestras de mucosa intestinal (obtenidas mediante raspado del yeyuno medio), hígado, MLD y MST (aproximadamente 0.5 to 1.0 g) se colectaron en micro tubos de 2 ml y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. También se

recolectaron muestras de sangre de la arteria carótida (10 ml) para analizar la concentración sérica (CS) de AA libres. Todas las muestras se almacenaron a -82°C hasta su análisis.

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales (% base húmeda).

Dieta	1	2	3	4	5
	Relación Leu: Lis DIE, (%)				
Ingredientes, %	88	100	120	140	160
Trigo	80.26	80.26	80	78	79.52
Salvado de trigo	12	12	11.18	11.41	10
Almidón de maíz	3	2.9	3	3	3
Gluten de maíz	-	-	2.5	3.5	3.5
Fosfato di-cálcico	0.35	0.35	0.25	0.36	0.37
Aceite de soya	0.94	0.94	-	0.64	0.36
Piedra caliza	1.33	1.33	1.36	1.32	1.31
Sal	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
Pre-mezcla de vit. y min.*	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
L-Lisina · HCl	0.65	0.65	0.63	0.62	0.62
L-Leucina	-	0.1	0.011	0.1	0.257
L-Treonina	0.32	0.32	0.26	0.25	0.25
DL-Metionina	0.16	0.16	0.11	0.1	0.1
L-Triptófano	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
L-Isoleucina	0.16	0.16	0.1	0.1	0.1
L-Valina	0.18	0.18	0.12	0.1	0.1
L-Fenilalanina	0.09	0.09	0.01	-	-
L-Histidina	0.04	0.04	0.02	0.01	0.01

* Adicionada por kg de dieta: vitamina A, 4800 IU; vitamina D3, 800 IU; vitamina E, 4.8 IU; vitamina K3, 1.6 mg; riboflavina, 4 mg; D-ácido pantoténico, 7.2 mg; niacina, 16 mg; vitamina B12, 12.8 mg; Zn, 64 mg; Fe, 64 mg; Cu, 4 mg; Mn, 4 mg; I, 0.36 mg; Se, 0.13 mg.

Cuadro 2. Composición de nutrientes de las dietas experimentales (% , base húmeda).

	Relación Leu: Lis DIE, (%)				
	88	100	120	140	160
<i>EN calculada, cantidad de Ca, y P disponible</i>					
EN (MJ/kg)	10.4+	10.39	10.3	10.34	10.36
Total Ca, %	0.61	0.61	0.6	0.61	0.61
P disponible, %	0.23	0.23	0.23	0.25	0.23
<i>Cantidad PC y contenido de AA totales, %</i>					
PC	13.92	14.03	15.19	15.63	15.99
Arginina	0.65	0.64	0.7	0.69	0.7
Histidina	0.35	0.35	0.37	0.36	0.36
Isoleucina	0.57	0.55	0.59	0.6	0.61
Leucina	0.84	0.92	1.12	1.3	1.48
Lisina	0.84	0.84	0.87	0.86	0.9
Metionina	0.34	0.32	0.33	0.33	0.34
Fenilalanina	0.65	0.64	0.68	0.7	0.7
Treonina	0.66	0.6	0.66	0.62	0.63
Triptófano	0.2	0.21	0.2	0.21	0.21
Valina	0.72	0.69	0.74	0.72	0.74

1.3.4 Purificación y extracción de RNA total

Las muestras de mucosa de yeyuno, hígado, MLD y MST se procesaron para extraer RNA total usando Trizol (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA, USA), de acuerdo con lo reportado por Méndez et al. (2011). El ARN purificado se diluyó en 30 µL de agua libre de ARNasa y se almacenó a -82°C. La concentración de ARN total se determinó espectrofotométricamente (Helios β, Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA) a 260 nm, y la pureza de ARN se determinó usando la relación A260/A280, el cual fluctuó entre 1.8 a 2.0 (Sambrook and Russell, 2001). La integridad de ARN total se evaluó mediante electroforesis en gel con 1% de agarosa. Todas las muestras de ARN tuvieron buena calidad con una relación 28S:18S ARNr de aproximadamente 2.0:1 (Sambrook and Russell, 2001).

1.3.5 Transcripción inversa.

Aproximadamente 2 µg de ARN total se trataron con 1 U de DNasa I (1 U/µl; Invitrogen) y 6 µl de buffer de transcripción inversa 5x en una reacción completa de 30 µl con agua tratada con DEPC; la reacción se llevó a cabo durante 15 min a temperatura ambiente y 15 min a 70 °C para detener la reacción. La transcripción inversa inició con muestras de ARN tratadas con DNasa, la adición de 1µl de random primers (150 ng/µl, Invitrogen) y 1 µl de solución de dNTPs (10 µM de cada uno), la reacción se incubó a temperatura ambiente y después se enfrió en hielo durante 1 min; se agregaron 3 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de inhibidor de ribonucleasa (40U/µl; ARNasa OUT, Invitrogen) y 2 µl de buffer de transcripción inversa 5x, y se incubaron a 42 °C durante 2 minutos para estabilizar la de reacción antes de la adición de 1 µl de la enzima transcriptasa inversa (200 U/µl; RT - Superscript III, Invitrogen). La reacción se incubó a 42 °C durante 50 minutos.

La mezcla se incubó a 70 °C durante 15 min y después se enfrió en hielo para detener la reacción. Las muestras de ADNc se cuantificaron espectrofotométricamente y se diluyeron en una concentración final de 50 ng/μl.

1.3.6 PCR en tiempo real

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los ARNm transportador de AA b^{0,+}, CAT-1 y de miosina (cadena pesada de isoforma IIB) de acuerdo a sus secuencias publicadas en el GenBank (Cuadro 3). Las fibras de miosina tipo IIB representan aproximadamente el 80% de las fibras totales en algunos músculos del cerdo (Czerwinski y Martin, 1994) y se expresan ampliamente en MLD y MST de los cerdos (Lefaucheur et al., 2002). Además, se utilizó el gen de ARNr 18S (GenBank AY265350) como testigo endógeno para normalizar las variaciones del ARNm. Antes de comenzar, se llevó a cabo el PCR punto final para estandarizar las condiciones de amplificación para cada par de oligonucleótidos y con el fin de confirmar la especificidad de los productos de PCR relacionados con su ARNm, se clonó una muestra de cada producto del PCR en un vector TOPO 4.0 (Invitrogen) y secuenciado al Davis Sequencing Facility (Davis, CA, USA).

Las expresiones de b^{0,+}, CAT-1, y miosina se estimaron mediante ensayos de PCR cuantitativo (qPCR), utilizando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Corp., Glen Burnie, MD, USA) en un Chromo 4-DNA Engine con el software MJ Opticon Monitor 3.1 (Bio-Rad, Herefordshire, England). El equipo se calibró con una curva estándar utilizando los ARNr 18S clonados en un vector TOPO 4.0. La curva estándar se obtuvo utilizando concentraciones conocidas de diluciones en serie de 100 veces del ADNc de ARNr 18S. Las reacciones de qPCR contenían 50 ng de ADNc, 0.5 μM de cada primer

específico, 12.5 µl de 2x SYBR Green/ROX qPCR Master Mix y agua libre de ADNasa/ARNasa para completar un volumen final de 25 µl. Se usó ARNr 18S como gen de referencia para normalizar la cantidad de ADN amplificado. Las condiciones de PCR usadas para la amplificación y cuantificación fueron: una etapa de desnaturalización inicial (95 °C durante 1 min), seguido por 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 30 s; alineación a 56 °C durante 15 s, y extensión a 72 °C durante 30 s) y un programa de curva de desnaturalización (60 °C a 90 °C). Se midió la fluorescencia al final de cada ciclo y cada 0.2 °C durante el programa de desnaturalización.

1.3.7 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza utilizando el GLM de SAS (Statistical Analysis System 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). Para las variables de crecimiento, los análisis de datos se hicieron utilizando el peso inicial como covariable y el corral fue la unidad experimental. También se realizaron análisis de regresión para establecer la proporción óptima en la dieta de Leu: Lis en la que se maximice la respuesta de rendimiento (GDP y CA). Niveles de probabilidad de $P \leq 0.05$ y $0.05 < P \leq 0.10$ fueron definidas como las diferencias y tendencias significativas respectivamente.

Cuadro 3. Primers para análisis de qPCR de ADNc de ARNm de transportadores de aminoácidos, ARNm de miosina, y ARNm de 18S ribosomal

ARNm	Oligonucleótido	Posición (pb) en el templado	Secuencia	Tamaño del amplicon (pb)
b^{0,+} AT (SLC7A9)(GenBank accession No. EF127857)				
	Sentido	1-19	5'-CGGAGAGAGGATGAGAAGT-3'	562
	Antisentido	545-562	5'GCCCCGCTGATGATGATGATGA-3'	
CAT-1 (GenBank accession No. AY371320)+				
	Sentido	4239-4258	5'-GTCGGTTGCAAAGACCATT-3'	329
	Antisentido	4548-4567	5'-GAGCGGTGCTGACAACAGTA-3'	
Miosina, cadena pesada 4 (GenBank accession No. NM_001123141)				
	Sentido	4582-4599	5'-AGATTCTGACCTGACTG-3'	340
	Antisentido	4904-4921	5'-TCTCCCTCCATCTTCTTC-3'	
ARNr18S (GenBank accession No. AY265350)				
	Sentido	236-255	5'-GGCCTCACTAAACCATCCAA-3'	295
	Antisentido	511-530	5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC-3'	

1.4 Resultados

Uno cerdo del tratamiento 2 murió por causas ajenas al experimento; el resto de los animales permaneció saludable durante todo el experimento. El análisis de PCR tiempo real fue validado mediante la secuenciación de sus productos finales y los resultados revelaron que los productos para b^{0,+}, CAT-1, miosina y 18S ARNr fueron 100% homólogos con sus correspondientes secuencias esperadas reportadas en el GenBank. La expresión del 18S

ARNr es muy estable y su contenido puede ser usado como un marcador endógeno para normalizar la expresión de los otros genes en respuesta a diferentes estímulos (Liao et al., 2009). Por tanto, en este estudio también se eligió normalizar la expresión relativa del ARNm para $b^{0,+}$, CAT-1 y miosina con respecto a la expresión del 18S ARNr, usando los niveles de expresión del 18S ARNr en el epitelio del intestino delgado y los músculos.

Los valores de expresión relativa de los transportadores de AA catiónicos y miosina se presentan en el Cuadro 4. La expresión de $b^{0,+}$ en yeyuno fue mayor en cerdos con la relación Leu: Lis 120%, en comparación con la relación 88% ($P = 0.013$) y 160% ($P = 0.045$). No se observó diferencia entre la relación 88 y 160% ($P = 0.575$). En hígado, la expresión de $b^{0,+}$ fue inferior en cerdos alimentados con la relación 120%, en comparación con la de 88 ($P = 0.002$) y 160% ($P = 0.005$); pero no hubo diferencias entre la relación 88 y 160% ($P = 0.595$). La expresión de $b^{0,+}$ en MLD y MST no fue diferente ($P > 0.10$). En general, la expresión mayor y menor de $b^{0,+}$ en cerdos se observó en yeyuno y en el músculo ST, respectivamente. La expresión de CAT-1 en yeyuno fue menor en cerdos con la relación Leu: Lis 120% ($P = 0.009$) o la de 160% ($P = 0.020$), comparada con la relación 88%; pero no se observaron diferencias entre 120 y 160% ($P = 0.743$). No hubo efecto de la relación Leu: Lis en la expresión de CAT-1 en hígado y MST ($P > 0.10$). En MLD, la expresión de CAT-1 fue mayor en cerdos alimentados con la relación 88% Leu: Lis, comparada con los que recibieron 120% ($P = 0.003$), y tendió a ser superior que en cerdos alimentados con la relación 160% ($P = 0.099$); los cerdos alimentados con la relación 120% expresaron más CAT-1 que aquéllos con la relación 160% ($P = 0.050$). En general, la mayor expresión de CAT-1 se observó en el MLD mientras que la más baja fue en yeyuno. La expresión de miosina en MLD fue superior en cerdos alimentados con la relación 120%

comparada con los que recibieron 88% ($P = 0.044$) o 160% ($P = 0.041$), pero no hubo diferencias entre las relaciones 88 and 160%. En MST, la expresión de miosina tendió a ser superior en cerdos con la relación 120% que aquéllos con la relación 160% Leu: Lis ($P = 0.086$), pero no hubo diferencia entre las relaciones 88 y 120% ($P = 0.266$) o 160% ($P = 0.441$).

Los valores de AA libres en suero se presentan el Cuadro 5. El incremento de la relación Leu: Lis de 88 a 120% elevó la CS de Arg ($P = 0.039$), Leu ($P = 0.014$) y Fen ($P = 0.012$); disminuyó la de Val ($P = 0.050$) y tendió a reducir Ile ($P = 0.068$) y Met ($P = 0.076$). Incrementos adicionales en la relación Leu: Lis, de 120 a 160%, disminuyó Arg sérica ($P = 0.002$), Lis y Fen ($P = 0.001$). Valores séricos de Ile ($P = 0.044$), Lis ($P = 0.008$) y Val ($P = 0.030$) fueron inferiores, Arg tendió a ser inferior ($P = 0.086$), pero Leu fue mayor ($P = 0.003$) en cerdos alimentados con la relación 160% que en los que recibieron la relación 88%.

Los resultados de comportamiento de los cerdos se presentan en el Cuadro 6. Se observó una respuesta lineal y cuadrática ($P < 0.01$) en la GDP de los cerdos a medida que se incrementó la relación Leu: Lis de 88 a 160%. Como resultado, el peso final se incrementó de manera lineal y cuadrática ($P < 0.01$) con el incremento en esta relación. En contraste, el CDA disminuyó linealmente y la conversión alimenticia mostró una respuesta cuadrática ($P < 0.01$) a medida que incrementó la relación Leu: Lis. La relación Leu: Lis DIE óptima para GDP y CA se estimó utilizando análisis de regresión, y resultó de 104% ($r^2 = 0.93$; Figura 1) y 109% ($r^2 = 0.96$; Figura 2)

Cuadro 4. Efecto de la relación DIE Leu: Lis en la expresión relativa de genes que codifican $b^{0,+}$ y CAT-1 en yeyuno, hígado y *Longissimus dorsi* (MLD) y *Semitendinosus* (MST), y miosina en MLD y MST de cerdos (Unidades arbitrarias; relación de $b^{0,+}$ ARNm: 18S ARNr)¹.

		DIE Leu: Lis, (%)			EEM	Valor de P ²		
		88	120	160		C1	C2	C3
b ^{0,+}								
	Yeyuno	0.081	0.76	0.224	0.178	0.013	0.045	0.575
	Hígado	0.162	0.033	0.145	0.021	0.002	0.005	0.595
	MLD	0.015	0.015	0.004	0.007	0.963	0.311	0.332
	MST	0.003	0.003	0.002	0.001	0.891	0.682	0.586
CAT-1								
	Yeyuno	0.278	0.109	0.13	0.044	0.009	0.743	0.02
	Hígado	0.051	0.021	0.076	0.025	0.416	0.152	0.495
	MLD	1.283	0.178	0.783	0.192	0.003	0.05	0.099
	MST	0.007	0.011	0.022	0.006	0.703	0.219	0.121
Miosina								
	MLD	8.546	19.534	8.338	3.055	0.044	0.041	0.963
	MST	1.874	3.293	0.919	0.818	0.266	0.086	0.441

¹ Cada media representa 8 cerdos por tratamiento.

² Contrastes para relaciones Leu: Lis: C1, 88 vs 120; C2, 120 vs 160; C3, 88 vs 160.

Cuadro 5. Efecto de la relación DIE Leu: Lis en la concentración de aminoácidos libres en suero de cerdos en crecimiento¹.

Aminoácidos	DIE Leu: Lis, %			EEM	Valor de P ²		
	88	120	160		C1	C2	C3
Arginina	4.00	4.79	3.37	0.23	0.039	0.002	0.086
Isoleucina	3.50	2.20	2.02	0.44	0.068	0.793	0.044
Leucina	2.01	3.67	4.26	0.39	0.014	0.31	0.003
Lisina	4.38	4.90	3.05	0.28	0.225	0.001	0.008
Metionina	1.25	0.90	0.72	0.21	0.076	0.319	0.014
Fenilalanina	2.30	2.82	2.04	0.16	0.012	0.001	0.145
Treonina	6.09	5.32	5.44	0.31	0.136	0.286	0.208
Valina	9.69	4.88	4.15	1.53	0.05	0.742	0.03

¹ Cada media representa 8 cerdos por tratamiento.

² Contrastes para relaciones Leu: Lis: C1, 88 vs 120; C2, 120 vs 160; C3, 88 vs 160.

1.5 Discusión

Este experimento se realizó para determinar si las variaciones en la relación Leu: Lis DIE de la dieta afecta la expresión de dos transportadores de AA catiónicos ($b^{0,+}$ y CAT-1) y miosina, además de la CS de AA, como indicador de la disponibilidad de AA para la síntesis de proteína muscular. Adicionalmente, se estimó relación Leu: Lis DIE que maximice el crecimiento y eficiencia alimenticia de cerdos en crecimiento. Lis es transportado a través de la membrana celular por los sistemas $b^{0,+}$ y CAT-1 (Majumder et al., 2009). El sistema $b^{0,+}$ intercambia Leu por Lis (Torras-Llort et al., 2001) y la absorción intestinal de Lis por $b^{0,+}$ está acoplada con la salida de Leu del enterocito (Pineda et al.,

2004). Como se reporta anteriormente por diversos autores (Hatzoglou et al., 2004; Bröer, 2008; Liao et al. (2009), la expresión de los transportadores de AA catiónicos representan su actividad funcional. Así, se considera que los valores de expresión de los genes analizados en el presente experimento reflejan la abundancia de las respectivas proteínas que codifican. En este estudio, los cerdos alimentados con la relación 120% de Leu: Lis DIE expresaron aproximadamente 19 y 3 veces más $b^{0,+}$ en yeyuno, en comparación con los que recibieron las relaciones de 88 o 160%. Similarmente, García-Villalobos et al. (2012) reportaron que el exceso de Leu en una dieta base en trigo con una relación Leu: Lis de 160%, y nivel adecuado de Lis, redujo alrededor de 70% la expresión $b^{0,+}$ en yeyuno. Estos resultados, combinados con los de García-Villalobos et al. (2012) indican que tanto la deficiencia como el exceso de Leu en la dieta pueden afectar negativamente la absorción de Lis. En contraste a yeyuno, la expresión de $b^{0,+}$ en hígado fue menor en cerdos con la relación 120% comparada con las relaciones 88 y 160%. Debido a la mayor expresión de $b^{0,+}$ en yeyuno de cerdos con la relación 120%, se esperaría un mayor flujo de Lis del intestino al hígado. De acuerdo con Hatzoglou et al. (2004), el suministro abundante de AA reduce pero la deficiencia incrementa la abundancia y actividad transportadores de AA (teoría de regulación adaptativa). Por tanto, el incremento esperado en el suministro de Lis a hígado en cerdos con la relación 120% puede explicar parcialmente la reducción en la expresión de $b^{0,+}$ en hígado. Con respecto a la expresión de $b^{0,+}$ en MLD y MST, Vekony et al. (2001) reportaron que $b^{0,+}$ se expresa principalmente en células epiteliales. En este estudio, en coincidencia con estos autores, la expresión de $b^{0,+}$ en músculos fue menor de 1% con respecto a su expresión en yeyuno.

Cuadro 6. Efecto de la relación DIE Leu: Lis en ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA), y conversión alimenticia (CA) de cerdos¹.

	DIE Leu: Lis, %						Valor de P	
Variable	88	100	120	140	160	EEM	Linear ²	Cuadr. ³
Peso corporal, kg								
Inicial	28.58	27.41	28.24	27.75	28.25	1.308	0.935	0.682
Final	41.68	42.73	42.52	41.05	40.72	0.325	0.001	0.002
GDP, kg	0.644	0.698	0.689	0.618	0.603	0.016	0.003	0.002
CDA, kg	1.40	1.42	1.36	1.30	1.31	0.034	0.008	0.778
CA, g/g	2.17	2.03	1.97	2.11	2.16	0.054	0.698	0.006

¹Cada media representa 16 réplicas/corraleta (1 macho, 1 hembra) por tratamiento.

² Valor de P por efecto lineal.

³Valor de P por efecto cuadrático.

El transportador CAT-1 es un sistema independiente de Na y de alta afinidad por L-Arg y L-Lis, cuya expresión es modulada por factores de crecimiento, hormonas y nutrientes (Hatzoglou et al., 2004). La expresión del gen para CAT-1 incrementa bajo condiciones de limitación de AA y reduce con el suministro abundante de AA; esta regulación ocurre a nivel de la síntesis y estabilidad de ARNm (Majumder et al., 2009). Así, la abundancia del ARNm para CAT-1 en cerdos con diferentes niveles de AA en la dieta parece reflejar la abundancia del transportador. En este experimento, los cerdos con la relación 120% de Leu: Lis tuvieron la expresión más baja de CAT-1 en yeyuno, lo cual coincide con la expresión más alta de $b^{0,+}$ en yeyuno. Con base en la teoría adaptativa (Hatzoglou et al., 2004), la baja expresión de CAT-1 sugiere una mayor disponibilidad de Lis extracelular en cerdos alimentados con la relación 120%. En coincidencia con estos

resultados, la expresión de miosina en+ MLD de cerdos con la relación 120% fue más del doble comparado con la de cerdos alimentados con la relación 88 ó 160%. CAT-1 es mayormente expresado en células no-epiteliales (Vekony et al., 2001). En concordancia, la expresión promedio de CAT-1 en MLD del presente estudio fue alrededor de 400-veces superior que en yeyuno. Notablemente, la expresión de CAT-1 en MLD fue más de 50-veces superior que en MST, lo cual sugiere la existencia de diferencias en la expresión de transportadores de AA catiónicos no solamente relacionados con el tipo de tejido sino también con el tipo de músculo.

Miosina es el principal componente de los filamentos gruesos y la más abundante de las proteínas musculares (Czerwinski and Martin, 1994). Según Lefaucheur et al. (2002), las fibras del tipo IIB, las cuales representan aproximadamente el 80% del total de fibras en algunos músculos de cerdos, son ampliamente expresadas en MST y MLD de cerdos. Gunawan et al. (2007) reportan una mayor expresión de la isoforma IIB de miosina en LD, en comparación con ST de cerdos. En este estudio, miosina se expresó en ambos músculos pero la expresión en MLD fue aproximadamente 6-veces mayor que en MST. Más aún, los cerdos alimentados con la relación 120% expresaron alrededor del doble de miosina en ambos músculos, en comparación con los cerdos que recibieron la relación 160%. Leu, tanto infundida (Wilson et al., 2010) como ingerida (Rieu et al., 2007) parece estimular la síntesis de proteína muscular, pero solamente si existen cantidades suficientes de los demás AA esenciales (Wilson et al., 2010). Aunque los cerdos con la relación 160% ingirieron más Leu, su expresión de miosina fue menor que aquéllos con la relación 120%, lo cual puede sugerir una reducida disponibilidad de otros AA como Lis. Notablemente, en el presente estudio, los cerdos alimentados con la dieta 120% tuvieron la mayor expresión de

miosina en ambos músculos además de $b^{0,+}$ en yeyuno. De acuerdo con Drummond et al. (2010), la expresión de transportadores de AA es un mecanismo regulador único asociado con la respuesta anabólica muscular después de que se incrementa la disponibilidad de AA. Estos resultados sugieren una asociación entre la relación Leu:Lis de la dieta, la absorción de Lis y la síntesis de proteína en el músculo.

La proteína exógena es la principal causa del incremento de AA libres en plasma de humanos colectada durante las primeras cuatro horas postprandial (Adibi y Mercer, 1973) por lo que el nivel de AA en la dieta parece reflejarse en su CS. En el presente estudio, la muestras de sangre usadas para el análisis de AA libres fueron colectadas 2.5 h postprandial.

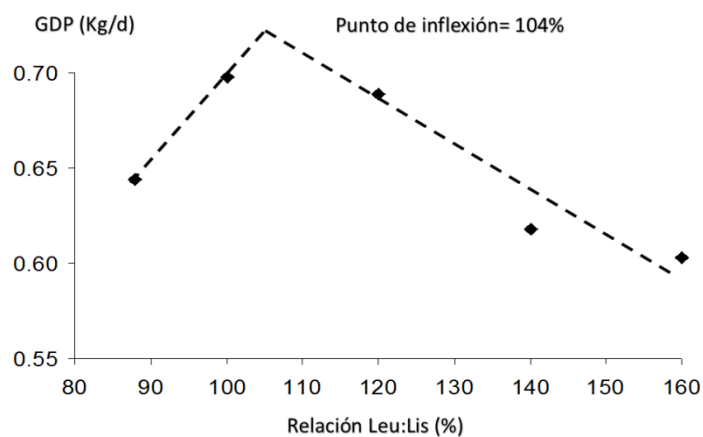


Figura 1. Inflexión ajustada con dos pendientes lineales para GDP en función a relaciones Leu: Lis DIE en cerdos de 25 a 45kg. Los puntos (♦) representan la media del tratamiento (n=8 observaciones por tratamiento). La relación óptima Leu:Lis de acuerdo al modelo de regresión fue 104% ($Y = 714.7 - 4.5 (104 - x)^2 - 2.15 (x - 104)$; $r^2 = 0.93$).

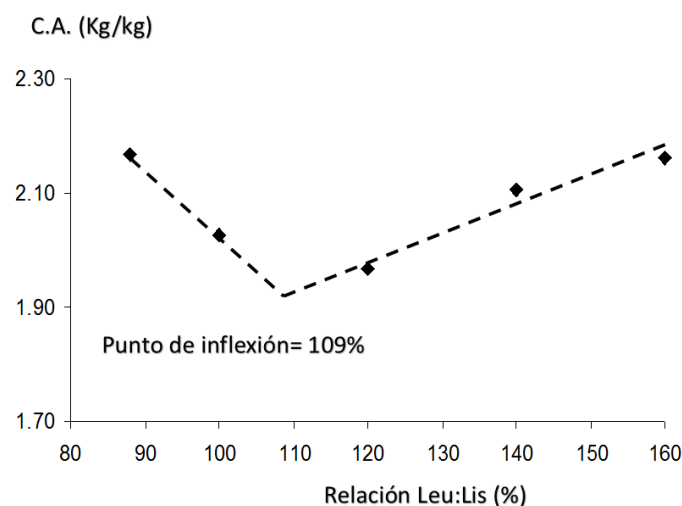


Figura 2. Inflexión ajustada con dos pendientes lineales para CA en función a relaciones Leu: Lis DIE en cerdos de 25 a 45kg. Los puntos (♦) representan la media del tratamiento (n=8 observaciones por tratamiento). La relación optima Leu: Lis de acuerdo al modelo de regresión fue 109% ($Y = 1.927 + 0.012 (109 - x)^2 - 0.005 (x - 109)$; $r^2 = 0.96$).

La CS de Lis no fue diferente entre cerdos que consumieron las dietas con las relaciones Leu: Lis 88 o 120%, pero en cerdos con la relación 160% fue aproximadamente 40% menor que en los cerdos con la relación 120%. La disminución de Lis en suero podría explicarse como resultado de un menor consumo de Lis, mayor acumulación de proteína que incremente la toma de Lis por la célula, o una deficiencia en su absorción. El consumo de Lis por cerdos con la relación 120% no fue diferente del de cerdos con la relación 160%, por tanto la reducción en el consumo no explica la menor CS de Lis en cerdos con la relación 160%. La expresión de miosina en MLD y MST de cerdos con la relación 160% fue alrededor de 40 y 30%, respectivamente, de la observada en cerdos con la relación

120% por lo que diferencias en la acumulación de proteína también se descarta. Por otra parte, la expresión de $b^{0,+}$ fue menor en cerdos con la relación 160% que en los de 120%. Por tanto, la menor CS de Lis parece resultar del efecto negativo del exceso de Leu en la dieta en la absorción de Lis.

Leu sérica en cerdos destetados y alimentados con exceso de Leu es superior que en cerditos que no reciben excesos en la dieta (Edmonds and Baker, 1987; Langer and Fuller, 2000; Wiltafsky et al., 2010). En coincidencia, la CS de Leu en el presente estudio fue 80 y 120% superior en cerdos con la relación 120% ó 160%, respectivamente, en comparación con los cerdos de la relación 88%. En contraste, la CS de Ile y Val en cerdos con la relación 120 y 160% se redujo a más del 50%, comparada con los cerdos de la relación 88%. Estos resultados también son consistentes con reportes previos (Edmonds and Baker, 1987; Wiltafsky et al., 2010), los cuales se explican como el resultado de un incremento en la actividad del complejo enzimático que cataboliza a los tres AA de cadena ramificada en cerdos con excesos de Leu (Block et al., 1987; Wiltafsky et al., 2010); además existen evidencias de la competencia por absorción entre estos AA (Hagihira et al., 1961). Por tanto se espera que un exceso de Leu en la dieta incremente el catabolismo o inhiba la absorción de Ile y Val, lo cual explica la reducción en la CS de estos AA cuando se proveen excesos de Leu como ocurre en las dietas con la relación 120 y 160%. Estos resultados son críticos debido a que la mayoría de los ingredientes empleados en la formulación de dietas prácticas para cerdos contienen exceso de Leu.

La GDP se maximizó con la relación Leu: Lis DIE entre 100 to 120% y la CA se maximizó a una relación de 120%. De manera interesante, se observó que la mayor GDP y la mejor CA de cerdos en este estudio coincide con los valores de expresión de $b^{0,+}$ en

yeyuno y la de miosina en MLD, además de la mayor CS de Lis. Más aún, los cerdos alimentados con la relación 160% tuvieron la menor GDP, CS de Lis, expresión de $b^{0,+}$ en yeyuno y expresión de miosina en MLD. Debido a que Lis era el primer AA limitante en todas las dietas, la combinación de los resultados de comportamiento, expresión de $b^{0,+}$ y miosina, y la CS de Lis apoyan la hipótesis de que la relación Leu: Lis en la dieta afecta la disponibilidad de Lis para crecimiento de los animales. Por otra parte, el incremento en el catabolismo de Ile y Val provocado por el exceso de Leu reduce la cantidad de Ile y Val disponibles (Harper et al., 1984). Así, el exceso de Leu en el presente estudio redujo los valores séricos de Ile y Val en los cerdos que recibieron la dieta con la relación 160%; sin embargo, Ile y Val parece que no son limitantes en esta dieta puesto sus valores séricos en los cerdos con la relación 120 o 160% no fueron diferentes, pero la GDP fue menor que en los cerdos con la relación 120%. Por tanto, el nivel de Lis en dietas prácticas que contienen exceso de Leu parece ser el factor más crítico.

El exceso de Leu en la dieta parece reducir el CDA (Edmonds and Baker, 1987; Wiltafsky et al., 2010) al disminuir la formación de serotonina (neurotransmisor involucrado en el control del consumo de alimento) puesto que Leu compite con Trp por transporte a través de la barrera sanguínea cerebral dentro del cerebro (Henry et al., 1996). Además, Ropelle et al (2008) encontraron que Leu disminuye la actividad de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) e incrementa la actividad de mTOR en el hipotálamo, lo cual conduce a una inhibición del neuropéptido Y, y concluyó que AMPK y mTOR interactúan en el hipotálamo para regular el consumo de alimento. En el presente estudio, el decremento lineal en la GDP a medida que se incrementó la relación Leu: Lis DIE de 100 a 160% estuvo estrechamente relacionada con la reducción lineal en el CDA. Sin embargo,

considerando el contenido analizado de AA de estas dietas, no hubo diferencia entre el consumo de los primeros AA limitantes (Lis, Tre, Met, Ile y Val). Por tanto, la disponibilidad de AA (especialmente Lis), más que el CDA, parece explicar la baja GDP de los cerdos con las dietas que tenían exceso de Leu.

La relación Leu: Lis DIE óptima en la dieta fue estimada en 104% para GDP y 109% para la CA de los cerdos de 28-43 kg. Estimaciones previas, usando dietas purificadas, se reportan de 100 % para cerdos de 10-20 kg (Chung and Baker, 1992) y de 110 % para cerdos en crecimiento de 25-50 kg (Wang y Fuller, 1989). Augspurger y Baker (2004) indican que el requerimiento de Leu DIE para cerdos de 10 a 20 kg, usando dietas con base en pasta de cacahuete-pasta de soya-suero de leche, es de aproximadamente 1.05 %, el cual corresponde a la relación 100 % Leu: Lis DIE. En un estudio publicado por Wiltafsky et al. (2010), la relación calculada 105 a 107% de Leu: Lis DIE en dietas trigo-cebada-pasta de soya para cerdos de 8-20 kg produjo la mejor respuesta en crecimiento. Con base en estos datos y los del presente estudio, la relación Leu: Lis DIE óptima de 100 a 110 % parece ser la más adecuada para cerdos en crecimiento, independientemente de la composición de la dieta.

1.6 Conclusión

La relación Leu: Lis DIE en la dieta afecta selectivamente la expresión de genes que codifican para los transportadores $b^{0,+}$ y CAT-1, y miosina, la CS de la mayoría de los AA esenciales, y el comportamiento (GDP y CA) de cerdos en crecimiento. Aunque esta relación también afectó el CDA, el consumo de AA no fue diferente. Existe una relación estrecha entre la expresión de $b^{0,+}$ en yeyuno y miosina en LD, la CS de Lis, la GDP y CA,

y la relación Leu: Lis DIE. La disponibilidad de Lis parece ser el factor más limitante en dietas con exceso de Leu para cerdos en crecimiento. Por tanto, el consumo y la disponibilidad de Lis deberían ser considerados cuando se ofrezcan dietas con exceso de Leu (> 140% Leu: Lis DIE).

1.7 Literatura citada

Adibi SA, Mercer DW. 1973. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *J. Clin. Invest.* 52: 1586-1594.

AminoDat® 4.0. Platinum version, 2010. Evonik Degussa GmbH, Hanau-Wolfgang, Germany.

Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS (2000). Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *J. Nutr.* 130: 139-145.

Augspurger NR, Baker DH (2004). An estimate of the leucine requirement for young pigs. *Anim Sci.* 79: 149-153.

Block KP, Aftring RP, Mehard WB, Buse MG (1987). Modulation of rat skeletal muscle branched-chain a-keto acid dehydrogenase in vivo: effects of dietary protein and meal consumption. *J. Clin. Invest.* 79: 1349-1358.

Bröer S. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88: 249-286.

- Chung TK, Baker DH (1992). Ideal amino acid pattern for 10-kg pigs. *J. Anim. Sci.* 70: 3102-3111.
- Czerwinski M, Martin JM (1994). Effect of Somatotropin on Myosin Expression in Pigs. *J. Anim. Sci.* 72: 1204-1208.
- Davoli R, Fontanesi L, Cagnazzo M, Scotti M, Buttazzoni L, Yerle M, Russo V (2003). Identification of SNPs, mapping and analysis of allele frequencies in two candidate genes for meat production traits: the porcine myosin heavy chain 2B (MYH4) and the skeletal muscle myosin regulatory light chain 2 (HUMMLC2B). *Anim. Genet.* 34: 221-225.
- Drummond MJ, Glynn EL, Fry CS, Timmerman KL, Volpi E, Rasmussen BB (2010). An increase in essential amino acid availability upregulates amino acid transporter expression in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298: E1011-E1018.
- Edmonds MS, Baker DH (1987). Amino acid excesses for young pigs: effects of excess methionine, tryptophan, threonine or leucine. *J. Anim. Sci.* 64: 1664-1671.
- García-Villalobos H, Morales-Trejo A, Araiza-Piña AB, Htoo KJ, Cervantes-Ramírez M (2012). Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 66: 257-270.

- Gunawan AM, Park SK, Pleitner JM, Feliciano L, Grant AL, Gerrard DE (2007). Contractile protein content reflects myosin heavy-chain isoform gene expression. *J. Anim. Sci.* 85: 1247-1256.
- Hagihira H, Lin EC, Samiy AH, Wilson TH (1961). Active transport of lysine, ornithine, arginine and cystine by the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4: 478-481.
- Harper AE, Miller RH, Block KP (1984). Branched-chain amino acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 4: 409-454.
- Hatzoglou M, Fernandez J, Yaman I, Closs E (2004). Regulation of cationic amino acid transport: The story of the CAT-1 transporter. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 377-99.
- Henry Y, Sève B, Mounier A, Ganier P (1996). Growth performance and brain neurotransmitters in pigs as affected by tryptophan, protein and sex. *J. Anim. Sci.* 74: 2700-2710.
- Langer S, Fuller MF (2000). Interactions among the branched-chain amino acids and their effects on methionine utilization in growing pigs: effects on nitrogen retention and amino acid utilization. *Brit. J. Nutr.* 83: 43-48.
- Lefaucheur L, Ecolan P, Plantard L, Gueguen N (2002). New Insights into Muscle Fiber Types in the Pig. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 719-730
- Liao SF, Vanzant ES, Harmon DL, McLeod KR, et al. (2009). Ruminant and abomasal starch hydrolysate infusions selectively decrease the expression of cationic amino acid transporter mRNA by small intestinal epithelia of forage-fed beef steer. *J. Dairy Sci.* 92: 1124-1135.

- Llames CR, Fontaine J (1994). Determination of amino acids in feeds: Collaborative study. J. Assoc. Off. Ana. Chem. 77: 1362-1366.
- Majumder M, Yaman I, Gaccioli F, Zeenko VV, et al. (2009). The hnRNA-Binding Proteins hnRNP L and PTB Are Required for Efficient Translation of the Cat-1 Arginine/Lysine. Transporter mRNA during Amino Acid Starvation. Mol. Cell Biol. 29: 2899–2912.
- Méndez V, Avelar E, Morales A, Cervantes M, et al. (2011). A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. Genet. Mol. Res. 10: 3251-3255.
- NOM-062-ZOO-1999 (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ochoa MLI. ed. Diario Oficial de la Federación. México (DF), México.
- NRC (1998). Nutrient Requirements of Pigs, 10th Revised edn. National Academy Press, Washington, D.C.
- Pineda M, Wagner CA, Broer A, Stehberger PA, et al. (2004). Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBATb0, AT. Biochem J. 377: 665-674.
- Rieu I, Balage M, Sornet C, Debras E, et al. (2007). Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. Nutr. 23: 323-31.

- Robbins KR, Saxton AM, Southern LL (2006). Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. *J. Anim. Sci.* 84(E. Suppl.):E155-E165.
- Ropelle ER, Pauli JR, Fernandes MFA, Rocco SA, et al. (2008). A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes* 57: 594-605.
- Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sunde J, Kiessling A, Higgs D, Opstvedt J, Venturini G, Rungruangsaktorrissen K (2003). Evaluation of feed protein quality by measuring plasma free amino acids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after dorsal aorta cannulation. *Aquac Nutr.* 9: 351-360.
- Suryawan A, Orellana RA, Fiorotto ML, Davis TA (2011). Leucine acts as a nutrient signal to stimulate protein synthesis in neonatal pigs. *J Anim Sci.* 89: 2004-2016.
- Torras-Llort M, Torrents D, Soriano-García JF, Gelpí JL, et al. (2001). Sequential Amino Acid Exchange across b₀,+/-like System in Chicken Brush Border Jejunum. *J. Memb. Biol.* 180: 213–222.
- Vekony N, Wolf S, Boissel JP, Gnauert K, Closs EI (2001). Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 40: 12387-12394.
- Wang TC, Fuller, MF (1989). The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs 1. Experiments by amino acid deletion. *British J Nutr.* 62: 17-89.

Wilson FA, Suryawan A, Gazzaneo MC, Orellana RA, et al. (2010). Stimulation of Muscle Protein Synthesis by Prolonged Parenteral Infusion of Leucine Is Dependent on Amino Acid Availability in Neonatal Pigs. *J Nutr.* 140: 264-270.

Wiltafsky MK, Pfaff MW, Xaver F (2010). The effects of branched-chain amino acid interactions on growth performance, blood metabolites, enzyme kinetics and transcriptomics in weaned pigs. *Brit J Nutr.* 103: 964-976.

Capítulo II:

Efecto de la suplementación de valina en dietas base trigo con exceso de Leucina en comportamiento productivo, expresión génica y concentración de aminoácidos en suero de cerdos en crecimiento

2.1 Resumen: Exceso de Leucina en la dieta reduce la expresión de transportadores de aminoácidos catiónicos $b^{0,+}$, absorción de Lisina y Arginina, consumo de alimento y ganancia diaria de peso de cerdos (GDP). Debido a que Valina compite con Leucina para su absorción, la adición de Valina podría corregir este efecto. Se realizó un experimento para analizar el efecto de la suplementación de valina en dietas base trigo (*Triticum aestivum*) suplementadas con Lisina, Treonina y Metionina, además contenía exceso de Leucina e Isoleucina en el comportamiento productivo, expresión del gen codificante de $b^{0,+}$ y concentración sérica de AA. Seis cerdos (30.3 ± 2.1 Kg PV) fueron usados. Los tratamientos fueron base trigo con exceso de Leucina e Isoleucina (Trat 1) y Trat 1 más 0.44 % de L-Valina (T2). Al final del estudio (21 días), 12 cerdos fueron sacrificados; se recolectó sangre de la vena yugular para la analizar AA en suero y además mucosa de yeyuno para medir la expresión de $b^{0,+}$. La adición de Valina incremento ($P < 0.05$) GDP, conversión alimenticia y Valina, Lisina y Arginina sérica, pero no afectó ($P > 0.10$) la expresión de $b^{0,+}$. También, el contenido de Valina en la dieta basal fue más bajo que lo calculado, el incremento en suero de Lisina aunado con la mejora en el comportamiento productivo podría sugerir que el exceso de Leucina limita la disponibilidad de Valina y que al suplementarlo Valina podría corregir algún efecto negativo por el exceso de Leucina.

Palabras claves: Transportador de aminoácidos; Leucina; Cerdos; Suero; Valina

2.2 Introducción

Dietas bajas en proteína suplementadas con aminoácidos cristalinos son usados para mejorar el balance de AA de la dieta y reducir la excreción de nitrógeno en cerdos, debido a que típicamente las dietas altas en proteína contienen exceso de algunos aminoácidos como Leucina, el cual puede tener un efecto negativo en la disponibilidad de otros aminoácidos incluyendo Valina, Isoleucina y Lisina. Wiltafsky et al., (2010) reportaron una reducción en la tasa de crecimiento y concentración sérica de Valina en cerdos alimentados con dietas con exceso de Leucina, principalmente por el antagonismo entre aminoácidos de cadena ramificada. También, nosotros recientemente encontramos que el exceso de Leucina reduce el comportamiento productivo y concentración sérica de Isoleucina, Valina, Lisina y Treonina ya que la adición de Isoleucina no corrige este efecto (Méndez et al., 2011b). Estos datos indican que la suplementación de Valina e Isoleucina pudieran ser necesarios para corregir el efecto del exceso de Leucina, particularmente la disponibilidad de Lisina.

La absorción intestinal de Lisina es facilitada por el transportador de aminoácidos catiónicos $b^{0,+}$ en intercambio por aminoácidos neutros, especialmente Leucina (Bröer, 2008). El exceso de Leucina reduce su expresión en cerdos (Morales et al., 2011; García-Villalobos et al., 2012) y la adición de Isoleucina no corrigió el efecto (Méndez et al., 2011b), indicando que la disponibilidad de Lisina se ve comprometida por el exceso dietético de Leucina. Valina también es un aminoácido neutro que compite con Leucina por su absorción, pero no hay información disponible acerca del efecto en la expresión intestinal de $b^{0,+}$ y absorción de Lisina. Este experimento fue realizado para evaluar el efecto de la adición de Valina en la expresión de $b^{0,+}$ aminoácidos en suero y

comportamiento productivo en cerdos en crecimiento alimentados con una dieta base trigo suplementada con aminoácidos con exceso de Leucina e Isoleucina

2.3 Materiales y métodos

Los cerdos utilizados en este experimento fueron cuidados de acuerdo con los lineamientos establecidos en la norma oficial mexicana para el cuidado animal (NOM-062-ZOO-1999, 2001). La prueba de comportamiento productivo con duración de 21 días se realizó usando 16 cerdos (Large White $\times$ Duroc: peso inicial 30.3 ± 2.1 kg). Los cerdos fueron alojados individualmente con 8 cerdos por tratamiento. Los cerdos fueron alimentados por parejas con un consumo restringido promedio de 1.31 kg/cerdo por día, el cual equivale a 2.5 veces el requerimiento de energía de mantenimiento (NRC, 1998). La dieta basal fue suplementada con AA sintéticos (Cuadro 7) para cubrir o exceder los requerimientos de aminoácidos para cerdos de 20 – 50 kg (NRC, 1998). El contenido de Leucina analizada en la dieta basal fue 70 % por arriba del nivel óptimo; exceso de Isoleucina fue adicionado para prevenir un desbalance en la relación Leucina: Isoleucina. La segunda dieta fue la basal suplementada con 0.44% de L-Valina (+Val). Seis cerdos por tratamiento fueron sacrificados al final del periodo experimental, después de 2.5 horas de ayuno se colectó mucosa de yeyuno y muestras de sangre yugular. El ARNtotal se extrajo de las muestras de mucosa (Méndez et al., 2011a) para analizar la expresión del ARNm para $b^{0,+}$ por PCR cuantitativo usando Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas Corp.) en un Chromo 4-DNA Engine (Bio-Rad). El análisis de varianza de los datos fue desarrollado usando el proceso GLM (SAS Inst. Inc., Cary, NC), y comparación de medias mediante el uso de la prueba de Student's. El nivel de probabilidad $P \leq 0.05$ se determinó como diferencia significativa.

2.4 Resultados y discusión

La ganancia diaria de peso ($P = 0.044$) y conversión alimenticia ($P = 0.015$) incrementaron con el incremento de Valina en la dieta (Cuadro 8). Debido a que el consumo de alimento fue similar para todos los cerdos, el incremento en la ganancia de peso fue atribuido solamente al incremento de Valina. El contenido analizado de Valina en la dieta basal fue 0.55% o su equivalencia a 0.49% de digestibilidad íleal estandarizada, fue ligeramente inferior al valor calculado de valina total 0.59%. El requerimiento de digestibilidad íleal estandarizada de Valina para cerdos de 20 a 50 kg fue estimado en 0.56 % por Waguespack et al. (2012) basado en esta estimación, el incremento en ganancia de peso y conversión alimenticia en cerdos alimentados con dieta alta en valina podría haber corregido una aparente deficiencia de Valina.

El sistema $b^{0,+}$ es el más importante de los sistemas de transporte para aminoácidos catiónicos en células epiteliales. De acuerdo con Bröer (2008), el mecanismo de absorción de $b^{0,+}$ para aminoácidos catiónicos es acoplado a un contraflujo con aminoácidos neutros, especialmente Leucina. En el presente estudio, la expresión de $b^{0,+}$ en yeyuno no fue afectada ($P > 0.10$) por el incremento de Valina (Cuadro 8). Recientemente, exceso de Leucina en dietas base trigo similar a la dieta usada en el presente estudio disminuyó substancialmente la expresión de $b^{0,+}$ en yeyuno de cerdos (García-Villalobos et al., 2012; Morales et al., 2011). Sin embargo, la adición de Isoleucina fallo para corregir el efecto por el exceso de Leucina (Méndez et al., 2011a). La combinación de resultados de estos estudios indican que Valina y no Isoleucina corrigen el efecto negativo del exceso de Leucina en la expresión de $b^{0,+}$.

Cuadro 7.- Composición de las dietas experimentales

Ingrediente, %	Dieta ^{2,3}	
	Basal	+Val ⁴
Trigo	94.68	94.68
L-Lisina HCl	0.88	0.88
L-Treonina	0.27	0.27
DL-Metionina	0.10	0.10
L-Leucina	0.80	0.80
L-Isoleucina	0.43	0.43
L-Valina	0.10	0.54
Almidón de Maíz	0.44	-
Carbonato de calcio	1.35	1.35
Fosfato dicálcico	0.40	0.40
Sal yodatada	0.35	0.35
Premezcla de vitaminas y minerales ¹	0.20	0.20

¹Suplementación por kg: Vit. A, 4800 UI; Vit D3, 800 UI; Vit E, 4.8 IU; Vit K3, 1.6 mg; Riboflavina, 4 mg; D-Ácido pantoténico 7.2 mg; Niacina, 16 mg; Vit. B12, 12.8 µg; Zn, 64 mg; Fe, 64 mg; Cu, 4 mg Mn, 4 mg; I, 0.36 mg; y Se, 0.13 mg.

²Calculadas para proveer 10.4 MJ EN por kilogramo de dieta.

³Valores de AA analizados de dietas basal y +Val, respectivamente: Lis, 1.07 y 1.09; Tre, 0.58 y 0.61; Met, 0.28 y 0.28; Leu, 1.51 y 1.56; Iso, 0.86 y 0.90; Val, 0.55 y 0.94; y Trip, 0.15 y 0.15.

⁴+Val= 44% L-Val.

Al adicionar Valina se incrementó la concentración sérica de Valina (+700%; $P < 0.001$) e Isoleucina (+38 %; $P = 0.034$) pero no afectó Leucina ($P = 0.556$) (Cuadro 9) Langer et al., (2000) reportaron que el exceso de Leucina en la dieta disminuyó Valina sérica mientras que Wiltafsky et al., (2009) observaron un incremento de Valina e Isoleucina en suero de los cerdos debido a un alto contenido en los niveles de valina en la dieta. Además en el presente estudio Val incrementó la concentración sérica de Lisina ($P = 0.006$), Arginina ($P = 0.008$) y una tendencia al incremento de Metionina ($P = 0.067$). Debido a que la expresión de $b^{0,+}$ no fue afectada por la adición de Valina, la alta concentración de Arginina y Lisina sugieren que suplementar Valina podría incrementar la actividad de $b^{0,+}$.

2.5 Conclusión

En conclusión, el incremento en suero de Lisina, Arginina y Valina en este estudio indican que el incremento de Valina en la dieta compensa algo del efecto negativo del exceso de Leucina, mejorando el comportamiento productivo de cerdos en crecimiento.

Cuadro 8.- Comportamiento productivo, y expresión génica de $b^{0,+}$ (unidades arbitrarias: Relación de ARNm con ARN de subunidad ribosomal18) de cerdos alimentados por pareja con dieta alta en Leucina y dos niveles de suplementación de Valina

Variable	Dieta		EEM ²	Valor P
	Basal	+Val ¹		
GDP	0.470	0.540	0.001	0.044
CDA	1.311	1.311	0.000	1.000
Conversión alimenticia	2.820	2.450	0.089	0.015
$b^{0,+}$ en yeyuno	0.100	0.110	0.006	0.370

¹+Val=0.44% L-Val

²Basado en 8 observaciones por dieta para comportamiento productivo y 6 observaciones por dieta en expresión génica.

Cuadro 9.- Concentración sérica (mg/100 mL) de aminoácidos en cerdos alimentados por pareja con dieta alta en Leucina y dos niveles de suplementación de Valina

Aminoácido	Dieta		EEM ²	Valor de P
	Basal	+Val ¹		
Arginina	2.45	3.16	0.150	0.008
Isoleucina	3.05	4.19	0.330	0.034
Leucina	5.69	6.06	0.424	0.556
Lisina	6.17	8.28	0.424	0.006
Metionina	1.03	0.84	0.066	0.067
Fenilalanina	1.18	1.33	0.077	0.199
Treonina	5.24	5.04	0.453	0.767
Valina	1.03	7.01	0.437	<0.001

¹+Val = 0.44% L-Val.

²Basado en 6 observaciones por dieta.

2.6 Literatura citada

- Bröer, S. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88:249–286.
- García-Villalobos, H., A. Morales-Trejo, B. A. Araiza-Piña, J. K. Htoo, and M. Cervantes-Ramírez. 2012. Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs. *Arch. Anim. Nutr.* doi:10.1080/1745039X.2012.697351
- Langer, S., P. W. D. Scislowski, D. S. Brown, P. Dewey, and M. F. Fuller. 2000. Interactions among the branched-chain amino acids and their effects on methionine utilization in growing pigs: effects on plasma amino- and keto-acid concentrations and branched-chain keto-acid dehydrogenase activity. *Br. J. Nutr.* 83:49–58.
- Méndez, V., E. Avelar, A. Morales, M. Cervantes, A. Araiza, and D. González. 2011a. A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughter house. *Genet. Mol. Res.* 10:3251–3255.
- Méndez, V., A. Morales, M. Cervantes, A. Araiza, and H. García. 2011b. Effect of dietary leucine and isoleucine on productive performance and myosin expression in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 89(Suppl. 1):330 (Abstr.).
- Morales, A., M. A. Barrera, A. B. Araiza, R. T. Zijlstra, H. Bernal, and M. Cervantes. 2011. Effect of excess levels of lysine and leucine in wheat-based, amino acid fortified diets on the mRNA expression of two selected cationic amino acid transporters in pigs. *J. Anim.*

Physiol. Anim. Nutr. doi:10.1111/j.1439-0396.2011.01266

National Research Council (NRC). 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th rev ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Waguespack, A. M., T. D. Bidner, R. L. Payne, and L. L. Southern. 2012. Valine and isoleucine requirement of 20- to 45-kilogram pigs. J. Anim. Sci. doi:10.2527/jas.2011-4454

Wiltafsky, M. K., M. W. Pfaff, and F. X. Roth. 2010. The effects of branched-chain amino acid interactions on growth performance, blood metabolites, enzyme kinetics and transcriptomics in weaned pigs. Br. J. Nutr. 103:964–976.

Wiltafsky, M. K., B. Schmidlein, and F. X. Roth. 2009. Estimates of the optimum dietary ratio of standardized ileal digestible valine to lysine for eight to twenty-five kilograms of body weight pigs. J. Anim. Sci. 87:2544–2553.

III. Conclusiones generales

La absorción de los AA a nivel celular esta mediada por, necesidades de la célula, tipo de órgano, sistema de transporte y concentración de sustrato. Por lo tanto, al incrementar la concentración de Leu en la dieta, se reduce significativamente la concentración en sangre de Iso y Val. Pero, en el segundo experimento se incrementó la concentración de Val en la dieta, lo que aumenta su disponibilidad y la posibilidad de ser absorbido a nivel intestinal; los resultados sugieren que esto favoreció su absorción, debido al aumento en la concentración circulante en sangre de este AA. Además, al adicionar Val a la dieta, ocurre una “corrección” en la relación entre AA de cadena ramificada, ya que no solo se incrementó la concentración de Val, además Iso sin afectar la concentración de Leu.

En el mismo sentido, se detectó a nivel de la mucosa de yeyuno, una mayor actividad al sistema $b^{0,+}$, que de acuerdo a la literatura es el principal sistema en la absorción de Lis en células epiteliales; y dado que la expresión de una proteína se correlaciona directamente con su función, entonces concuerda con una mayor expresión del ARNm en la relación Leu: Lis 120%. Explicando parcialmente el incremento en GDP ya que posiblemente al mejorar el perfil de AA a nivel celular, y posiblemente se incrementara la tasa de síntesis de proteína muscular, debido a que se observó una mayor expresión génica del ARNm para miosina en MLD en la relación Leu: Lis 120%.

En experimentos anteriores donde se probó la relación Leu: Lis 160% mostraron un efecto negativo en la ganancia diaria de peso; resultado similar al obtenido con la misma relación en el primer experimento; Además, en el experimento se observó que la relación Leu: Lis 100%, tuvo el mejor desempeño productivo de las relaciones evaluadas, cabe

señalar que un resultado similar se obtiene del análisis de inflexión ajustada, indicando que la relación óptima es Leu: Lis 104% para GDP y Leu: Lis 109% en el caso de CA. Interesantemente, al adicionar valina en un 0.44% en la dieta (segundo experimento) se aumenta la GDP y se mejora la CA.

En conclusión, la adición de AA de cadena ramificada en forma libre en dietas bajas en proteína para cerdos en crecimiento modifica la expresión de los transportadores de AA catiónicos $b^{0,+}$ en yeyuno, íleon, hígado, MLD, aumentando la concentración sérica de Arg, Iso, Lis y Val, además incrementa la GDP y CA. Por lo tanto, se requiere más investigación para determinar el efecto a nivel celular de la relación de los tres AA de cadena ramificada con lisina en la síntesis de proteína en músculo.

Literatura citada

- Anthony, J. C., Gautsch Anthony, T., Kimball, S. R. & Jefferson, L. S 2000 Orally Administered Leucine Stimulates Protein Synthesis in Skeletal Muscle of Postabsorptive Rats in Association with Increased eIF4F Formation. Journal of Nutrition
- Barrera M, Cervantes M, Sauer WC, Araiza AB, et al. (2004). Ileal amino acid digestibility and performance of growing pigs fed wheat-based diets supplemented with xylanase. J. Anim. Sci. 82: 1997-2003.
- Cervantes M., Sauer W.C., Morales A., Araiza B., Espinoza S., Yáñez J. 2009. Nutritional manipulation of pigs to decrease environmental pollution. Revista Computadorizada de Producción Porcina Volumen 16 (número 1)

- Davis, T. A., A. Suryawan, R. A. Orellana, H. V. Nguyen, and M. L. Fiorotto. 2008. Postnatal ontogeny of skeletal muscle protein synthesis in pigs. *J. Anim. Sci.* 86 (E. Suppl.):E13–E18.
- Fan M.Z., Kim S. W., Applegate T. J., y Cervantes M. 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.
- Fox HL, Kimball SR, Jefferson LS, Lynch CJ. 1998. Amino acids stimulate phosphorylation of p70s6k and organization of rat adipocytes into multicellular clusters. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C206–C213.
- Guay, F., S. M. Donovan, and N. L. Trottier. 2006. Biochemical an 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.
- Han, J. M. Seung Jae Jeong, Min Chul Park, Gyuyoup Kim, Nam Hoon Kwon, Hoi Kyoung Kim, Sang Hoon Ha, Sung Ho Ryu, and Sunghoon Kim (2012), Leucyl-tRNA Synthetase Is an Intracellular Leucine Sensor for the mTORC1-Signaling Pathway, *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2012.02.044
- 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
- Nathalie Le Floc’h Winfried Otten Elodie Merlot. 2011. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications *Amino Acids* 41:1195–1205

- Noor N., Tripathi T., Moin S., Faiz A. 2010. Possible Effect of Histamine in Physiology of Female Reproductive Function: An Updated Review in M. Shahid et al. (eds.), Biomedical Aspects of Histamine
- NRC, 2012: Nutrient Requirements of Swine, 11th revised edn. National Academy Press, Washington, DC.
- Sreekumaran, K.N. and K. R. Short. 2005. Hormonal and Signaling Role of Branched-Chain Amino Acids. J. Nutr. 135:1547S–1552S.
- Wu G1, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE, Yin Y. 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. Amino Acids. 37(1):153-68