

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS**



**GENES RELACIONADOS CON LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA EN  
CERDOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA:**

**MIGUEL ANGEL BARRERA SILVA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Ph. D. MIGUEL CERVANTES RAMIREZ**

MEXICALI, Febrero del 2010

La presente tesis titulada **“GENES RELACIONADOS CON LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA EN CERDOS”**, realizada por el **M.C. Miguel Angel Barrera Silva**; fue dirigida y asesorada por el **Ph. D. Miguel Cervantes Ramírez**, siendo aceptada, revisada y aprobada por el Consejo Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

## **DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

Consejo Particular

**PRESIDENTE**

---

Dr. Miguel Cervantes Ramírez

**SINODAL**

---

Dra. Adriana Morales Trejo

**SINODAL**

---

Dr. Benedicto Alfonso Araiza Piña

**SINODAL**

---

Dr. Daniel González Mendoza

**“POR LA REALIZACION PLENA DEL HOMBRE”**

## *Dedicatoria*

# *Agradecimientos*

## RESUMEN

Este experimento se realizó para evaluar el efecto de la adición de leucina y lisina a dietas a base de trigo en el comportamiento productivo y expresión de los genes de miosina y transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT y  $b^{0+}$ ) en yeyuno, músculo largo dorsal (MLD) y semitendinoso (MST), e hígado. Se utilizaron 20 cerdos de un peso promedio de  $16.4 \pm 1.7$  kg asignados a cuatro tratamientos, con base en 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, + lisina, treonina y metionina para cubrir los requerimientos, T2) igual al T1 + 0.35 % de lisina, T3) T1 + 0.15% de leucina, T4) T2 + 0.15% de leucina. Cuando se analizaron los tratamientos por nivel de aminoácido, se tuvo una interacción para GDP y CA al comparar el efecto individual de cada uno de los aminoácidos, La adición de leucina a la dieta sin adición con lisina (T1 vs. T3) redujo ( $P \leq 0.05$ ) la GDP, pero cuando se le adicionó lisina no hubo diferencia ( $P > 0.10$ ) (T2 vs T4); la CA también se deterioró ( $P \leq 0.05$ ) con la adición de leucina sin lisina adicional (T1 vs T3), pero la adición junto de lisina mejoró ( $P \leq 0.05$ ) la CA en la dieta adicionada con leucina (T3 vs. T4); el CDA no se afectó por la adición de ninguno de los aminoácidos a la dieta. Expresión relativa de ARNm para  $b^{0+}$ , la adición de leucina redujo la expresión de este gen ( $P=0.002$ ) únicamente en yeyuno, al compara el efecto individual de cada aminoácido en yeyuno tendió a reducir ( $P \leq 0.10$ ) la expresión del ARNm de  $b^{0+}$  al adicionar leucina en dietas sin adicionar lisina (T1 vs T3) y también la redujo en dietas adicionadas con lisina, (T2 vs T4); en MLD hubo una reducción ( $P \leq 0.05$ ) al adicionar leucina en dietas con adición de 0.35% de lisina (T2 vs T4); En MST no se observó diferencias ( $P > 0.05$ ) al adicionar leucina a dietas sin (T1 vs T3) ni con la adición de 0.35% de lisina (T2 vs T4).

En hígado no se encontraron efectos por al adicionar leucina con o sin lisina adicional ( $P > 0.10$ ). Expresión relativa de ARNm para CAT, en MLD no hubo efecto ( $P = 0.621$ ) con la adición de leucina; en MST hubo incremento ( $P = 0.007$ ); en hígado tuvo una reducción ( $P = 0.002$ ) efecto de leucina. Al hacer comparaciones por tratamientos individuales la expresión de CAT en yeyuno y MLD no se observaron diferencias con la adición de leucina con (T2 vs T4) o sin lisina adicional (T1 vs T3); en MST tendió a aumentar ( $P \leq 0.10$ ) en la expresión cuando se adicionó leucina a dietas sin lisina adicional (T1 vs T3), también se elevó la expresión ( $P \leq 0.05$ ) cuando se adicionó leucina con adición de de lisina (T2 vs T4), en hígado hubo una reducción ( $P \leq 0.01$ ) al adicionar leucina a dietas adicionadas con lisina (T2 vs T4) y no se tuvo diferencias ( $P > 0.10$ ) al adicionar leucina a dietas sin adicionar lisina sintética (T1 vs T3). Expresión relativa de ARNm para miosina En MLD hubo una disminución por efecto de la adición de leucina ( $P = 0.000$ ). En MST hubo una reducción en la expresión de ARNm de miosina únicamente por efecto de leucina ( $P = 0.015$ ) en las comparaciones individuales la expresión de miosina en MLD hay una reducción en la expresión de miosina ( $P \leq 0.05$ ) cuando se adicionó leucina sin lisina adicional (T1 vs T3) y también se observó una reducción ( $P \leq 0.05$ ) al adicionar leucina a dietas con adición de lisina (T2 vs T4); en MST se encontró una reducción en la expresión de miosina ( $P \leq 0.05$ ) cuando se adicionó leucina en dietas sin agregar lisina sintética (T1 vs T3), pero no se observaron diferencias ( $P > 0.10$ ) cuando se adicionó leucina y se agregó 0.35% de lisina (T2 vs T4). Hubo un efecto negativo en el comportamiento productivo, y a nivel celular con los genes relacionados con la síntesis de proteína en las dietas adicionadas con leucina. Quizás esto se deba a que leucina interactuó con isoleucina y valina, ya que estos contienen una estructura química semejante y compitan por el transporte en el epitelio intestinal o para pasar la membrana celular, reduciendo así la síntesis de proteína.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	5
<b>CONTENIDO.....</b>	7
<b>INDICE DE CUADROS.....</b>	11
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	13
<b>LISTA DE ABREVIACIONES .....</b>	14
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	16
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	18
<b>2.1 EXPRESIÓN GENÉTICA.....</b>	18
<i>2.1.1 Concepto.....</i>	18
<i>2.1.2 Expresión genética en eucariotas y procariontes.....</i>	18
<b>2.2 REPLICACIÓN.....</b>	19
<i>2.2.1 Enzimología de la replicación.....</i>	19
<i>2.2.2 Mecanismos de reacción.....</i>	20
<i>2.2.3 Etapas del proceso de replicación .....</i>	21
<i>2.2.3.1 Iniciación:.....</i>	21
<i>2.2.3.2 Orígenes de la replicación.....</i>	21
<i>2.2.3.3 Proteínas de iniciación.....</i>	22
<i>2.2.3.4 Unión entre la iniciación y la elongación.....</i>	22
<i>2.2.3.5 Elongación.....</i>	23
<i>2.2.3.5.1 Maduración de los fragmentos de Okazaki.....</i>	24
<i>2.2.3.6 Terminación, final de la elongación.....</i>	25

<b>2.3 RETROTRANSCRIPCIÓN.....</b>	25
<b>2.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....</b>	26
<i>2.4.1 PCR en tiempo real:.....</i>	27
<b>2.5 TRANSCRIPCIÓN.....</b>	28
<i>2.5.1 Tipos de Ácidos Ribonucleicos (ARN).....</i>	28
<i>2.5.2 Región estructural.....</i>	29
<i>2.5.3 Función reguladora.....</i>	30
<i>2.5.4 Enzimología de la transcripción: mecanismo de la reacción ARN polimerasa.....</i>	30
<i>2.5.5 Orientación de la secuencia.....</i>	31
<i>2.5.6 Carácter asimétrico.....</i>	31
<i>2.5.7 Transcripción en eucariotas y procariotas.....</i>	32
<i>2.5.8 RNA polimerasas.....</i>	32
<i>2.5.9 Etapas del proceso de transcripción.....</i>	33
<i>2.5.10.1 Iniciación.....</i>	33
<i>2.5.10.2 Elongación del ARN.....</i>	33
<i>2.5.10.3 Terminación.....</i>	34
<b>2.6 CRECIMIENTO.....</b>	34
<b>2.7 SINTESIS DE PROTEINA.....</b>	35
<i>2.7.1 Activación de la síntesis de proteína.....</i>	35
<b>2.8 REQUERIMIENTOS DE AMINOÁCIDOS.....</b>	36
<b>2.9 TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS.....</b>	37
<b>2.9.1 Transportadores de aminoácidos catiónicos.....</b>	38



<b>2.10 MIOSINA.....</b>	39
<b>2.11 AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA.....</b>	40
<i>2.11.1 Leucina.....</i>	41
<i>2.11.2 Leucina en la activación del mTOR (activación de la síntesis de proteínas).....</i>	43
<b>3. HIPOTESIS.....</b>	46
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	47
<b>4.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>	47
<b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	47
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	48
<b>5.2 SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS.....</b>	48
<b>5.2 ANALISIS DE LABORATORIO.....</b>	49
<i>5.2.1 Extracción del ARN.....</i>	49
<i>5.2.2 Transcripción Reversa (RT).....</i>	50
<i>5.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real).....</i>	50
<i>5.2.4 Análisis Estadístico.....</i>	53
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	54
<b>6.1 Comportamiento productivo.....</b>	54
<b>6.2 Expresión relativa de los ARNm.....</b>	55
<b>6.2.1 Expresión relativa de ARNm para b<sup>0,+</sup>.....</b>	55
<b>6.2.2 Expresión relativa de ARNm para la proteína transportadora de aminoácidos CAT.....</b>	57
<b>6.2.3 Expresión relativa de ARNm para miosina.....</b>	60

<b>6.2.4 Expresión relativa de ARNm para b<sup>0+</sup>, CAT y miosina, en intestino delgado yeyuno, MLD, MST e hígado, Tratamientos vs Testigo.....</b>	62
<b>7. CONCLUSION.....</b>	69
<b>8. LITERATURA CITADA.....</b>	70

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Sistema de transportadores de aminoácidos en mamíferos.....	
Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales.....	
Cuadro 3.- Oligonucleótidos utilizados para PCR tiempo real.....	
Cuadro 4. Efecto de la adición de leucina (Leu) y lisina (Lis) a la dieta en la ganancia diaria de peso (GDP), consumo de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA) de cerdos en crecimiento alimentados con dietas a base de trigo.....	
Cuadro 5. Efecto de la adición de leucina (Leu) y lisina (Lis) en la expresión relativa del gen de la proteína transportadora de aminoácidos $b^{0,+}$ en intestino delgado (Yeyuno), músculo largo dorsal (MLD), músculo semitendinoso (MST) e Hígado de cerdos en crecimiento (unidades: relación moléculas de mRNA del $b^{0,+}$ y el 18S-rARN).....	
Cuadro 6. . Efecto de la adición de leucina (Leu) y lisina (Lis) en la expresión relativa del gen de la proteína transportadora de aminoácidos CAT en intestino delgado (Yeyuno), músculo largo dorsal (MLD), músculo semitendinoso (MST) e Hígado de cerdos en crecimiento (unidades: relación moléculas de mRNA del Cat y el 18S-rARN).....	
Cuadro 7. Efecto de la adición de leucina (Leu) y lisina (Lis) en la expresión relativa del gen de miosina en músculo largo dorsal (MLD) y músculo semitendinoso (MST) de cerdos en crecimiento (unidades: relación moléculas de mRNA de Miosina y el 18S-rARN).....	

Cuadro 8.- Efecto de la adición de leucina (Leu) y lisina (Lis) en la expresión relativa del gen de proteínas transportadoras y miosina, en intestino delgado (yeyuno), músculo largo dorsal (MLD), músculo semitendinoso (MST) e hígado de cerdos en crecimiento (testigo vs tratamientos).....

Cuadro 9. Expresión de ARNm para b<sup>0+</sup>, CAT y miosina, en intestino delgado (yeyuno), músculo largo dorsal (MLD), músculo semitendinoso (MST) e hígado (moléculas por nanogramos de ADNc).....

Cuadro 10. Análisis de correlación de proteínas transportadoras de aminoácidos (b<sup>0+</sup> y CAT) y miosina, con ganancia de peso y conversión alimenticia.....

Cuadro 11. Análisis de correlación de proteínas transportadoras de aminoácidos en intestino delgado (b<sup>0+</sup> y CAT), músculo largo dorsal y semitendinoso, con la expresión de miosina en músculo largo dorsal y semitendinoso.....

## INDICE DE FIGURAS

Figura1.- Activación de mTOR por leucina.....	
Figura 2.- Activación del mTOR por leucina, para formar el complejo de iniciación.....	
Figura 3. Integridad del ARN de Hígado, intestino y músculo.....	
Figura 4. Comparación de la expresión relativa de CAT en músculo largo dorsal y semitendinoso (Relación de los tratamientos respecto al testigo)...	
Figura 5. Comparación de la expresión relativa de Miosina en músculo largo dorsal y semitendinoso (Relación de los tratamientos respecto al testigo).....	

## LISTA DE ABREVIACIONES

**4E-BP1.**- Proteína ligadora 1

**A.**- Adenina

**AA.**- Aminoácidos

**AAC.**- Aminoácidos catiónicos

**ADN.**- Acido desoxirribonucleico

**ADNc.**- Acido desoxirribonucleico complementario

**ARN.**- Acido ribonucleico

**ARNm.**- RNA mensajero

**ARNt.**- RNA de transferencia

**C.**- Citosina

**CA.**- Conversión alimenticia

**CDA.**- Consumo diario de alimento

**dATP.**- desoxiadenosina 5'-trifosfato

**dCTP.**- desoxicitidina 5'-trifosfato

**dGTP.**- desoxiguanosina 5'-trifosfato

**dNDPs.**- desoxirribonucleótidos difosfato

**dNMP.**- desoxirribonucleótidos monofosfato

**dNTPs.**- desoxirribonucleótidos trifosfato

**dTTP.**- desoxitimidina 5'-monofosfato

**eIF4E.**- Factor eucariótico de iniciación 4E

**eIF4G.**- Factor eucariótico de iniciación 4G

**G.-** Guanina

**GDP.-** Ganancia diaria de peso

**GH.-** Hormona del crecimiento

**IGF-1.-** Factor de crecimiento insulínico tipo 1

**MLD.-** Músculo largo dorsal

**MST.-** Músculo semitendinoso

**T.-** Timina

**TCAA.-** Transportadores de aminoácidos catiónicos

**U.-** Uracilo

# 1. INTRODUCCIÓN

La vida depende de la capacidad de las células, para almacenar, recuperar, y expresar las instrucciones genéticas necesarias para producir y mantener un organismo vivo. La información se trasmite de una célula a sus descendientes mediante la división celular y de una generación a otra a través de las células reproductoras. Estas instrucciones se almacenan en el interior de cada una de las células en forma de genes, los cuales son elementos que contienen la información que determinan las características de las especies (Cabrera y Sanchez 2001).

La eficiencia productiva de los animales depende de diversos factores, destacando la velocidad de crecimiento y el consumo de alimento. El crecimiento depende de la capacidad de síntesis y acumulación de proteínas musculares, de la síntesis y actividad de proteínas funcionales como enzimas, y del suministro oportuno de energía y todos los aminoácidos.

La síntesis de proteína en las células animales es un proceso energéticamente muy costoso y complejo que involucra la acción coordinada y secuencial de diversos factores. 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. Así, es de esperarse la concentración de aminoácidos dentro de la célula forme parte del mecanismo de activación de la maquinaria responsable de la síntesis de proteína. La presencia o concentración de uno o más de los aminoácidos puede tener influencia en la síntesis de proteína.

Los AAs se han considerado por muchos años como elementos que funcionan exclusivamente como unidades de construcción de las proteínas, durante el proceso de síntesis de las mismas (Sreekumaran y Short, 2005). Sin embargo, se sugiere que estos



compuestos están involucrados también en otras etapas de la síntesis y que podrían participar en su regulación. Publicaciones recientes muestran evidencias de la función de algunos AA en la estimulación de la síntesis de proteína. Los AAs de cadena ramificada (Leu, Ile y Val), especialmente Leu, son identificados como elementos reguladores de este proceso (Sreekumaran y Short, 2005; Liu *et al.*, 2006). Los requerimientos de aminoácidos para animales, se han determinado experimentalmente y de manera intensa solo en algunos de ellos (ejemplo: lisina, metionina y treonina), mientras que para otros aminoácidos solo se han hecho estimaciones.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 EXPRESIÓN GENÉTICA**

#### ***2.1.1 Concepto***

Proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento o mecanismos mediante los cuales la célula traduce la secuencia de nucleótidos de un gen a la secuencia de aminoácidos de una proteína (Alberts *et al.* 2002).

#### ***2.1.2 Expresión genética en eucariotas y procariotas***

Todos los organismos de la misma especie inclusive los eucariotas, el contenido de ADN de todas sus células son idénticos. Contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas sus proteínas. Pero, no todos los genes se expresan al mismo tiempo en todas las células. Hay algunos genes conocidos como 'housekeeping genes' que codifican proteínas esenciales para la actividad celular y que son requeridos en todos los tipos celulares (Cabrera and Sánchez, 2001). Estos genes se expresan de manera relativamente constante, son utilizados para normalizar los RNAm de diferentes muestras (Silver, *et al.*, 2006).

La expresión del material genético se da en tres procesos: Replicación del material genético para su transmisión de copias idénticas a la descendencia; Transcripción del material genético en ARN para emplearse en la síntesis de proteínas dentro de la célula;

traducción de la información genética o síntesis de proteínas propiamente dicho (Cabrera and Sánchez, 2001; Alberts *et al.* 2002).

## **2.2 REPLICACIÓN**

La replicación es el proceso mediante el cual, a partir de una molécula de ADN progenitora se sintetiza una nueva, originándose así dos moléculas hijas, de secuencia idéntica a la del ADN original. Aunque la replicación constituye un aspecto esencial del metabolismo del ADN, también se debe de considerar como parte del mismo, otros procesos directa o indirectamente relacionados son: la recombinación o reordenamiento de la información genética, la mutación o alteración de la secuencia y la reparación de las alteraciones o daños en el ADN (Rodwell, 2001; Alberts, *et al.*, 2002.).

La replicación se produce en forma coordinada con la división celular, concretamente en la fase S durante la interfase previa a la mitosis, de forma que las dos células hijas reciben la misma dotación genética que tenía la célula madre. El inicio de la replicación del ADN obliga a la célula a emprender una división. Una vez iniciada la replicación no puede tener lugar la consiguiente división hasta que se haya completado dicha replicación. El proceso se lleva a cabo sin necesidad de una separación. La doble hélice se desenrolla gradualmente y sus dos hebras se van separando a la par que se produce su replicación (Sclafani and Holzen, 2007).

### ***2.2.1 Enzimología de la replicación***

Requerimientos de la reacción de síntesis de ADN:

Cebador: la síntesis de ADN requiere de un fragmento de hebra iniciador, denominado cebador, que aporta un grupo 3'OH libre. Se trata de un oligonucleótido, por

lo común ARN, que debe de estar apareado a la hebra progenitora de ADN, de forma complementaria y antiparalela.

Sustratos: Se utiliza como sustratos el conjunto de los 4 dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato): desoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP), desoxiguanosina 5'-trifosfato (dGTP), desoxicitidina 5'-trifosfato (dCTP) y desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP). Cada uno de ellos queda incorporado en el ADN nuevo la parte dNMP de la molécula. A estos efectos los dNMPs y los desoxirribonucleótidos difosfatos (dNDPs) son inactivos.

Cofactores: para su actividad óptima se requiere de un ion metálico como cofactor asociados con los dNTPs. In vitro este papel lo pueden desempeñar el  $Mn^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  es este último el que actúa en vivo.

El ADN Molde. El orden correcto de los dNMPs viene determinado por su complementariedad de bases con la secuencia de cada hebra de ADN, que actúa como modelo o plantilla, esta es una característica importante de la reacción (Cabrera and Sánchez, 2001).

### ***2.2.2 Mecanismos de reacción***

Se inicia la reacción con el apareamiento de un dNTP complementario al nucleótido de la hebra molde (ADN) en la posición 3' de la hebra en crecimiento (inicialmente, el ARN cebador; luego la hebra que se está sintetizando). La reacción consiste en la unión del dNTP seleccionado, bajo la forma de dNMP con la liberación de PPi. Ello implica una unión con un enlace fosfodiéster entre el fosfato alfa del dNTP que se incorpora al 3'-OH libre de la cadena en crecimiento. La ruptura del enlace fosfoanhídrido

del dNTP proporciona la energía necesaria para impulsar la reacción, ayudada por la subsiguiente hidrólisis del PP<sub>i</sub> a 2 P<sub>i</sub> catalizada por la pirofosfatasa. Tras muchas reacciones similares sucesivas, el producto es la nueva hebra de ADN (Lewin, 2000).

### ***2.2.3 Etapas del proceso de replicación***

#### *2.2.3.1 Iniciación:*

Apertura de la doble hélice en el origen de replicación creación de dos horquillas de replicación y síntesis de cebadores. La unión de proteínas de inicio a la secuencia de origen de replicación facilita la separación de las hebras. Dos helicasas inducen la separación de las hebras inicialmente en el origen y luego avanzando en sentidos opuestos y creando dos horquillas. Dos moléculas de ADN polimerasa comienzan la síntesis de un ARN cebador para la hebra conductora en cada horquilla (Lewin, 2000; Sclafani and Holzen, 2007).

#### *2.2.3.2 Orígenes de la replicación*

La replicación siempre comienza en puntos de la molécula de ADN con secuencias características. El caso de procariotas, el cromosoma tiene origen de replicación único, llamado oriC. En eucariotas como ya se ha comentado, la enorme longitud de los cromosomas requiere la existencia de numerosos orígenes de replicación. El proceso de replicación se realiza en la unidad funcional del genoma denominada replicón. Cada replicón contiene, pues, un origen de replicación y se replica mediante dos horquillas. Mientras en procariotas el cromosoma completo constituye un solo replicón. En eucariotas son numerosos y sufren la replicación en forma casi simultánea (Alberts, *et al.*, 2002; Sclafani and T. M. Holzen, 2007).

### *2.2.3.3 Proteínas de iniciación*

Tanto en procariotas como eucariotas, el origen de replicación es reconocido por varias moléculas proteicas. Que provocan el pliegue de la cadena de ADN y crean una tensión superhelicoidal negativa que facilita la separación de las hebras, generalmente ayudada por la abundancia de pares AT en esa región (Sclafani and T. M. Holzen, 2007).

### *2.2.3.4 Unión entre la iniciación y la elongación*

El desenrollamiento inicial en el tramo correspondiente al origen de replicación, por efecto de las proteínas de iniciación debe continuar avanzando por delante de la polimerasa, encabezando la horquilla de replicación. Además que se van sintetizando las hebras nuevas se debe de ir recuperando el enrollamiento de las nuevas dobles hélices. En estas operaciones de desenrollamiento o relajamiento y enrollamiento o compactación intervienen diversas proteínas especializadas. El complejo multiproteico formado por estas y por las ADN polimerasas, que viaja asociada a cada horquilla y realiza la replicación, se conoce como replisoma (Cabrera and Sánchez, 2001).

- a) Helicasas. Estas proteínas multiméricas (generalmente hexámeros) se unen al ADN en el origen y actúan separando sus dos hebras, un proceso que requiere la hidrólisis simultánea de ATP. Se crean así dos horquillas de replicación.
- b) Proteínas de unión de hebra sencilla. Una vez separadas las hebras por la helicasa, intervienen las proteínas de unión al ADN de cadena sencilla, que evitan el reapareamiento de las hebras. De esta forma las bases nitrogenadas pueden acoger a los nucleótidos que se incorporan en la replicación. Se les denominan como proteínas SSB (single strand binding proteins), en especial en

procariotas. En eucariotas desempeña esta función la proteína de replicación (RPA).

- c) Topoisomerasas. La separación de las hebras ocasionadas por progresión de la helicasa a lo largo de la cadena de ADN conlleva a la aparición de superenrollamientos positivos por delante de la horquilla. Para aliviar esa tensión se requiere algún tipo de mecanismo giratorio; de lo contrario, el superenrollamiento acumulado por delante de la horquilla impediría el avance de la replicación. Este problema se resuelve gracias a las topoisomerasas, enzimas que alteran el estado de superenrollamiento del ADN sin modificar en otros aspectos su estructura.
- d) Primasa. Las ADN polimerasas no son capaces de iniciar la síntesis de una molécula de ADN, es decir unir los dos primeros nucleótidos, sino sólo elongar una hebra preexistente; por ello el inicio de las hebras nuevas requieren de un cebador. Este es sintetizado por una polimerasa de ARN dirigida por ADN, denominada primasa (de primer, cebador en inglés), que produce cadenas cortas de ARN, complementarias de cada una de las hebras desemparejadas en el origen de replicación (Cabrera and Sánchez, 2001).

#### *2.2.3.5 Elongación*

La replicación no sólo depende de la ADN polimerasa, sino de numerosas enzimas y factores proteicos. Este conjunto de proteínas recibe el nombre de replisoma o complejo de replicación, se asocia entorno a la horquilla de replicación para participar de forma en la síntesis simultánea de ambas hebras. Mediante enzimas (ADN polimerasa) que sintetizan ADN en dirección 5' a 3', al abrirse la horquilla una de las hebras progenitoras se expone el

ADN en el sentido 3' a 5', por lo que la síntesis de su hebra complementaria transcurre adecuadamente sobre la horquilla. A esta hebra se le llama conductora o guía (leading strand), por el contrario la otra hebra se expone en sentido 5' a 3', por lo que no puede actuar como molde a medida que avanza la horquilla. Esta requiere de un mecanismo en particular que, en otras cosas, supone un desfase con la síntesis de la hebra conductora, por lo que se llama hebra retardada o retrasada (lagging strand) (Alberts, *et al.*, 2002).

La solución al problema de síntesis de la hebra retardada se reveló al observar que durante la replicación era posible aislar moléculas de pequeño tamaño de ADN recién sintetizado (menor en eucariotas que en procariotas). Conocidas como fragmentos de Okazaki. Se propuso un mecanismo que explicase la síntesis de la hebra retardada en paralelo al desplazamiento de la horquilla de replicación, consistente en la síntesis discontinua de la hebra retardada; cada fragmento de okazaki corresponde a una porción de dicha hebra, cuando el avance de la horquilla ha liberado suficiente longitud de hebra sencilla como para que la polimerasa la utilice como molde, en sentido 3' a 5'. La hebra sencilla forma un bucle, enrollado sobre la propia enzima, para permitir la síntesis 5' a 3' propio de la polimerasa. Lógicamente, la síntesis del fragmento de Okazaki requiere un ARN cebador, sintetizado por una actividad primasa que viaja en la horquilla y que también se sintetizó en el origen de replicación el único cebador requerido por la hebra conductora (Cabrera and Sánchez, 2001).

#### *2.2.3.5.1 Maduración de los fragmentos de Okazaki*

Para completar la síntesis de la hebra retardada, deben de unirse los fragmentos de Okazaki. Este proceso es denominado maduración, requiere de la eliminación de los cebadores, la elongación del fragmento adyacente para rellenar con ADN el fragmento



dejado por cada ARN cebador y la unión y empalme de los extremos resultantes para dar una hebra continua (Cabrera and Sánchez, 2001).

#### **2.2.3.6 Terminación, final de la elongación**

Este proceso no se conoce también como los anteriores. Se puede considerar, conceptualmente, que la terminación corresponde a varios aspectos. El primero de ellos es la finalización de la elongación por la ADN polimerasa, que se verifica en las dos horquillas de replicación de cada replicón, previsiblemente cuando en su avance alcancen a las horquillas respectivas de replicones adyacentes. Por otra parte como segundo problema, falta por aclarar cuál es el número de replicones implicados simultáneamente en la replicación de cada cromosoma, así como los mecanismos de control que coordina el proceso en todos ellos (Alberts, *et al.*, 2002).

### **2.3 RETROTRANSCRIPCIÓN**

La transcriptasa reversa, también conocida como ADNpolimerasa dependiente de ARN, amplifica copias de ADNc a partir de ARN, es decir forma un ADN de doble cadena empleando un molde de ARN, esta reacción se conoce como transcripción reversa. (Alberts *et al.* 2002). La transcripción reversa (en inglés, retrotranscription o RT) llevada a cabo junto con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es el método con mayor capacidad de detección de los disponibles para la medida de la expresión génica *in vitro*. La mezcla inicial contiene todos los componentes necesarios: muestras de ARN, transcriptasa inversa, ADN polimerasa, cebadores y dNTPs. El proceso comienza con la síntesis de una hebra de ADNc por la acción de la transcriptasa inversa, y en una segunda etapa se desnaturaliza separándose el ADNc y puede comenzar la ampliación según el

mecanismo de PCR normal, que amplifica o copia al ADNc por varios ciclos (Cabrera and Sánchez, 2001).

## **2.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas en inglés como PCR (Polymerase Chain Reaction), es una técnica utilizada en biología molecular, cuyo objetivo se fundamenta en la propiedad natural de la enzima polimerasa para replicar hebras de ADN. Esta técnica utiliza dos oligonucleótidos, también llamados cebadores o primers, de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, sintetizados por métodos químicos y cuyas bases son complementarias de los extremos iniciales y finales del fragmento de ADN que se va a copiar. Se utiliza un oligonucleótido diferente para cada uno de los dos extremos del fragmento de ADN, debido a que las hebras de ADN son copiadas en direcciones opuestas ya que la replicación siempre se realiza en un sentido 5' – 3' en cada una de las hebras de ADN. La copia de un fragmento de ADN se realiza en un período de aproximadamente uno a dos minutos, y ésta se repite por lo menos 30 ciclos. Cada ciclo consta de tres fases que se realizan a distinta temperatura: desnaturalización del ADN, alineación de los oligonucleótidos y por último la extensión síntesis del fragmento de interés. En el primer ciclo se ha obtenido una copia del fragmento de ADN, en los ciclos siguientes cada una de las copias del fragmento de ADN es copiada de nuevo, por esto se dice que la amplificación se realiza de forma exponencial (Paniagua, 2007).

Cada ciclo de reacción requiere un breve calentamiento para separar las dos hebras del ADN de doble hélice, la técnica depende de la utilización de una ADN polimerasa especial, aislada de una bacteria termófila, que es mucho más estable a temperaturas

elevadas que la polimerasa común, de modo que no se desnaturaliza por calentamientos repetitivos (Cabrera and Sánchez, 2001). Cada ciclo requiere solo 5 minutos (el tiempo depende del tamaño del fragmento que se planea amplificar. Los ciclo tienen tres pasos: desnaturalización 72 seg a 90°C, alineación 50 segundos a 54°C y extensión 2 min a 74°C) y el proceso completo es fácilmente automatizable. El método de PCR es extremadamente sensible: en una muestra puede detectar una sola molécula de ADN (Alberts *et al.* 2002).

#### **2.4.1 PCR en tiempo real:**

Reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presentes en la muestra original, o para identificar con muy alta probabilidad, muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión (también denominado valor T<sub>m</sub> melting temperature). Se puede dividir en las técnicas basadas en fluorocromos no específicos y técnicas basadas en sondas específicas. En las técnicas basadas en fluorocromos, el ADN, que ve multiplicada su cantidad con cada ciclo se une al fluorocromo (generalmente SYBR Green) produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para PCR en tiempo real, permite cuantificar sólo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización (Alberts *et al.* 2002).

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo y el inverso, cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN

polimerasa. Esto permite monitorear el patrón de fluorescencia y deducir el nivel de ampliación del gen. La mayoría de estos inconvenientes se han solucionado con la introducción del PCR realizado en tiempo real, que elimina cualquier proceso post-PCR puesto que monitorea la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. A diferencia del PCR convencional, que mide la acumulación de ADN al final de un número predeterminado de ciclos, con PCR en tiempo real esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de ADN formada. EL proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de medir leer la fluorescencia (Alberts *et al.* 2002). Los resultados son calculados a partir de los ct (cycle threshold su traducción es ciclo umbral), es el primer ciclo del PCR en el que se detecta producto amplificado.

## **2.5 TRANSCRIPCIÓN**

La transcripción consiste en la síntesis de una molécula de ARN a partir de la información genética contenida en la región codificante del ADN. Es decir dar lugar a una copia de ARN a partir de una secuencia molde en una de las hebras de ADN. Se trata de un proceso enzimático catalizado en todos los organismos por una enzima ARN polimerasas (polimerasas de ARN dependiente de ADN, o transcriptasa) (Lewin, 2000).

### ***2.5.1 Tipos de Ácidos Ribonucleicos (ARN)***

ARN mensajero (ARNm).- es una molécula de ARN que contiene la información genética procedente del ADN para utilizarse en la síntesis de proteínas, determina el orden en que se unirán los aminoácidos, y transporta la información al sitio de síntesis de

proteína. El ARNm es codificado del ADN molde en secuencias de nucleótidos arreglados dentro de codones, que consisten en tres bases cada uno. Este proceso requiere de dos tipos de ARN: el ARN de transferencia y el ARN ribosomal.

ARN de transferencia (ARNt).- El ARNt es una pequeña molécula de ARN (contiene alrededor de 74 – 95 nucleótidos) que transfiere aminoácidos específicos a la cadena polipeptídica en crecimiento que se encuentra en el sitio ribosomal de la síntesis de proteína, durante la fase de translación, La enzima aminoacil-ARNt-sintetasa se encarga de dicha unión, en un proceso que consume ATP. Contiene una región de tres bases llamada anticodón que puede ser par de las correspondientes bases de la región del codón sobre el ARNm, Cada molécula de ARNm puede ser unida únicamente a un tipo de aminoácido, pero el código genético contiene múltiples codones que especifica al mismo aminoácido, las moléculas de ARNt tienen también diferentes anticodones que pueden llevar el mismo aminoácido.

ARN ribosomal (ARNr).- es el componente central del ribosoma, la maquinaria de la manufactura de proteínas de toda célula viviente. La función del ARNr es proveer un mecanismo para descodificar al ARNm dentro de aminoácidos y para interactuar con los ARNts durante la traducción. El ARNt entonces otorga los aminoácidos necesarios correspondientes al apropiado codón del ARNm (Matheus, 2002).

### ***2.5.2 Región estructural***

Determina la expresión real del gen. Comprende dos tipos de secuencias, en función de su capacidad de expresión: intrones o regiones no codificantes en el interior del gen, y exones que incluye tanto las secuencias codificantes como las no codificantes de ambos

extremos del gen. El conjunto de intrones y exones de la región estructural se transcribe para dar lugar a un ARN llamado precursor o transcrito primario. Este requiere un proceso adicional, posterior a la transcripción, para dar nuevas moléculas de ARN. La mayor parte de los transcritos formados en eucariotas sufre dicho proceso, llamado maduración postranscripcional, siendo excepción los ARNm procarióticos, que se sintetizan directamente en su forma funcional (Murray,2000).

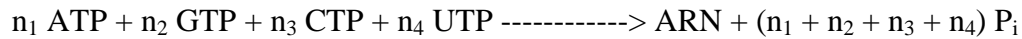
### ***2.5.3 Función reguladora***

Sin función codificante, está situada normalmente corriente arriba (es decir en el extremo 5´) de la región estructural. Contiene distintas regiones promotoras, encargada de interactuar con los factores de transcripción proteicos para regular positiva o negativa el inicio de la transcripción. Para la formación de ARNs se requiere la transcripción y en su caso la maduración postranscripcional. Solo el ARNm, sirve como punto de partida para sintetizar la proteína funcional codificada en el ADN y por tanto el producto génico. Ello además de la transcripción requiere de la traducción o síntesis del polipéptido y en la mayoría de los casos, el plegamiento proteico, necesario para su tráfico al lugar de acción y para el ejercicio de su función. Como consecuencia la definición del gen se ha ampliado: un gen es el conjunto de secuencias de ADN de todo tipo, de estructurales (intrones y exones) y reguladoras, necesarias para codificar un producto génico sea este un ARN maduro de cualquier tipo o una proteína funcional (Cabrera and Sánchez, 2001).

### ***2.5.4 Enzimología de la transcripción: mecanismo de la reacción ARN polimerasa***

Todos los organismos, procariotas y eucariotas, sintetizan ARN de acuerdo con una reacción catalizada por la ARN polimerasa (Murray, 2000).

El mecanismo de la reacción fisiológica, catalizada por la transcriptasa, es básicamente idéntico al de la ADN polimerasa. La reacción global es la siguiente:



La secuencia del ARN nuevo es idéntica a la hebra no molde del ADN, únicamente en lugar de timina (T) está presente el uracilo (U). Por ello esta hebra se llama codificante o informativa (corresponde a las bases del ARN y originará por traducción la secuencia de aminoácidos de la proteína) también se conoce como hebra no transcrita, hebra (con) sentido y hebra positiva (+). Por otra parte con lo anterior la hebra de ADN molde se llama ahora no codificante, no informativa, transcrita, antisentido o negativa (Murray, 2000).

### ***2.5.5 Orientación de la secuencia***

La posición de las base de cualquier gen o región del ADN relacionada con el proceso de transcripción siempre se refiera a la hebra no molde, codificante. Por convenio, su orientación es el sentido de la transcripción. Los nucleótidos de esta hebra siempre se enumeran a partir del punto de inicio de la transcripción al que se le asigna el valor +1 se denomina el origen de la transcripción los situados hacia el extremo 5´ se dice que están corriente arriba y se indican con números negativos consecutivos. Los nucleótidos en el sentido de transcripción, hacia el extremo 3´, están corriente abajo y se indican con números positivos continuos (Cabrera and Sánchez, 2001).

### ***2.5.6 Carácter asimétrico***

A diferencia de la replicación donde las hebras se copian simultáneamente (carácter simétrico), la transcripción nunca se produce en forma simultánea en las dos hebras. Al transcribirse el ARN a partir de una sola de las hebras del ADN, se dice que es un proceso asimétrico. La información para la síntesis de los diferentes ARNs de la célula están repartidas entre ambas hebras del ADN, de este modo unos ARNs se transcriben empleando como molde unas de las hebras, mientras que otros se transcriben, en sentido opuesto, sobre

la otra hebra. Las dos hebras de una región del ADN se transcriben en forma independiente y no simultánea, portando mensajes genéticos diferentes, se dice entonces que contiene genes solapantes (Cabrera and Sánchez, 2001).

### ***2.5.7 Transcripción en eucariotas y procariotas***

Una gran mayoría de ADN genómico de eucariotas nunca se transcribe (ADN no codificante). En procariotas la molécula de ARN mensajero resultante de la transcripción (transcrito primario) es ya funcional, no necesita pasar por el proceso de maduración postranscripcional y se utiliza inmediatamente como molde para la traducción, en el mismo compartimiento subcelular (puesto que no hay membrana nuclear). Existe por ello una asociación temporal y espacial íntima entre transcripción y traducción; el ARN mensajero puede empezar a traducirse antes de haberse completado su síntesis por transcripción. Por lo contrario la mayoría de los ARNts y ARNrs deben de sufrir maduración, análoga a la de eucariotas (Alberts, *et al.*, 2002.).

En eucariotas el transcrito primario, o ARN resultante de la transcripción, experimenta en el núcleo la maduración o procesamiento postranscripcional. Los ARNs maduros se transportan luego al citosol para participar en la traducción. Existe por lo tanto, una separación espacial y temporal entre la transcripción y la traducción (Alberts, *et al.*, 2002.).

### ***2.5.8 RNA polimerasas***

En procariotas y orgánulos subcelulares (mitocondrias y cloroplastos de eucariotas) se utiliza una sola ARN polimerasa (ARNpol) para sintetizar los 3 tipos de ARN celular (ARNm, ARNt y ARNr). En el núcleo de eucariotas existen tres ARNs



polimerasas diferentes (I, II, III) que sintetizan cada una distintos tipos de ARN (Paniagua, *et al.*, 2007).

### ***2.5.9 Etapas del proceso de transcripción***

Para que tenga lugar la transcripción es necesaria la presencia en la hebra molde llamada unidad de transcripción, que incluye la secuencia de ADN que se ha de transcribir más las dos secuencias consenso que la rodean (llamadas promotor y terminador). Tiene 3 fases iniciación, elongación y terminación (Lewin, 2000).

#### ***2.5.10.1 Iniciación***

Es la etapa más complicada de la transcripción. Requiere la separación de la hebras del ADN en un pequeño tramo cercano a la secuencia promotora, para permitir que la ARN polimerasa sintetice un fragmento corto de ARN (de unos 10 nucleótidos) por apareamiento con la hebra molde. La región del ADN que sufre este desenrollamiento parcial se llama burbuja de transcripción, esta forma el inicio y posteriormente, durante la elongación, se desplaza a lo largo del ADN junto con la ARNpol. Para la iniciación también se requiere la unión al ADN de proteínas llamadas factores de inicio de la transcripción o factores de transcripción (TF) (Matheus, 2002).

#### ***2.5.10.2 Elongación del ARN***

La ARN polimerasa continúa alargando la cadena del ARN mientras avanza por el ADN, desplazando junto con ella la burbuja de transcripción. El complejo de la elongación ya está formado por el ADN abierto, la ARNpol, y el ARN naciente. Durante el avance continuo ocurre lo siguiente:

- Por delante de la polimerasa se separan las dos hebras del ADN por ruptura de los puentes de hidrógeno (avance de la burbuja), la tensión creada por el efecto de desenrollamiento debe de ser compensada por las topoisomerasas.
- La polimerasa alarga el ARN añadiendo nucleótidos al extremo 3' del ARN naciente. El último tramo permanece dentro de la burbuja (ARN-ADN).

Por detrás de la polimerasa la cadena de ARN nueva se va separando de la hebra molde de ADN, saliendo de la burbuja y quedando como ARN de cadena sencilla. El ADN se vuelve a aparear en las dos hebras y se produce el enrollamiento de la doble hélice, de nuevo asistido por las topoisomerasas (Cabrera and Sánchez, 2001).

### 2.5.10.3 Terminación

La terminación en eucariotas, en contraste con la terminación en procariotas, requiere sólo un factor proteico eRF (factor de liberación eucariótico). Este único factor puede reconocer los tres codones de detención (UAA, UAG, y UGA) (Matthews, *et al.*, 2002).

## 2.6 CRECIMIENTO

El metabolismo celular es llevado a cabo por proteínas reguladas a niveles de transcripción, traducción y degradación de proteína. El crecimiento de células dentro de órganos, tejido y animales es en esencia por hipertrofia e hiperplasia. Hipertrofia se refiere al crecimiento del tamaño de la célula principalmente causado por incrementos en proteína y contenido de ARN, mientras que hiperplasia es el incremento en número de células, resultado del balance de proliferación y apoptosis (Lawrence and Fowler, 1997). El proceso del metabolismo de la proteína celular, incluye síntesis de proteína y degradación, esto es esencial para ambos tipos de crecimientos (Burrin *et al.*, 1997).

## 2.7 SINTESIS DE PROTEINA

### 2.7.1 Activación de la síntesis de proteína

La síntesis de proteína en las células musculares es un proceso bien organizado en el que participan varios componentes, en diferentes etapas bien definidas (Hayashi y Proud, 2007). La hormona de crecimiento (GH), Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) e insulina, desde el medio extracelular y a través de sus receptores transmembrana, envían señales hacia el interior de la célula para activar la maquinaria de síntesis. Una vez ingresada la señal, esta se transmite hacia el núcleo y ribosomas mediante una serie de fosforilaciones en cadena de proteínas (GTPasas). El elemento central de esta cadena, e iniciador de los genes de las proteínas musculares es un complejo molecular denominado mTOR (blanco de la rapamicina en mamíferos) (Miyazaki and Karyn 2008).

El proceso de síntesis de proteína o traducción se realiza en tres etapas: iniciación, elongación y terminación (Wang y Proud, 2006). En cada etapa participan factores de traducción que son activados o desactivados por alteraciones moleculares y estructurales provocadas por su fosforilación, reguladas a su vez por el complejo mTOR. Este controla al menos tres tipos de componentes de la maquinaria de traducción. El primero está en las proteínas ribosomales S6, componente del complejo de la sub-unidad ribosomal 40S y sus quinasas (S6Ks), las cuales son activadas por insulina mediante reacciones de fosforilación. En 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), en el

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

Hayashi y Proud, (2007), observaron en cultivos de tejidos que GH estimula rápidamente la síntesis de proteína y que este efecto es mediado por mTOR, puesto que cuando se añadió el cultivo un inhibidor (rapamicina) de este complejo, inhibió la síntesis de proteína previamente inducida por la GH. La activación del complejo mTOR por GH se inicia con la unión a su receptor en la membrana celular, lo cual incrementa la afinidad entre la quinasa JAK2 (Janus familia de tirosina quinasa) y el receptor de GH, resultando en la activación de JAK2; la fosforilación de las tirosinas en JAK2 y el receptor GH provoca la formación de sitios con alta afinidad para proteínas de esta cadena de señalización. (Argetsinger, *et al.*, 1993). Resultados de un estudio realizado por Hayashi y Proud, (2007) demuestran que GH actúa a través de la fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI) y la proteína quinasa B (PKB, también denominado Akt) para activar la cadena de señalización mTOR, provocando la activación de eEF2 y la formación de los complejos eIF4F. Esta información muestra una interrelación marcada entre GH y la maquinaria de síntesis de proteína reguladas por mTOR.

## ***2.8 REQUERIMIENTOS DE AMINOÁCIDOS***

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). En estas últimas se considera 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. Es decir la estimación del requerimiento de cada aminoácido se hace suponiendo que estos son utilizados solamente para formar proteínas, y no se toma en cuenta que también pueden participar alguna función en forma libre.

Los requerimientos de lisina, treonina y metionina para cerdos se han estudiado intensamente debido a que son el primer, segundo y tercer limitante, respectivamente, en las dietas típicas maíz, sorgo o trigo-pasta de soya. En contraste no se tiene ningún estudio realizado para determinar las necesidades de otros aminoácidos como fenilalanina, leucina y arginina. Los valores publicados en NRC (1998) son resultado de estimaciones realizadas con base en el contenido de estos en las proteínas musculares. Pero resultados recientes muestran que los AAs de cadena ramificada (leucina, isoleucina, y valina) forman parte de los mecanismos de activación de una cadena metabólica responsable de la síntesis de proteína (Blomstrand *et al.*, 2006).

## **2.9 TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS**

Los aminoácidos son necesarios para la supervivencia, intervienen en la síntesis de proteína, regulación del metabolismo, el crecimiento celular, y la producción de energía, entre otros. El paso de los aminoácidos a través de la membrana plasmática es llevado a cabo por proteínas llamadas transportadores que reconocen, unen y transportan a estos aminoácidos del medio extracelular al interior de la célula o viceversa.

La clasificación de los diferentes sistemas de transporte se hizo 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). En el Cuadro 1 se presentan los sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos.

### **2.9.1 Transportadores de aminoácidos catiónicos**

Han sido asociados 7 proteínas (asociados con 4 sistemas de transporte de AAC) son responsables para la absorción por el epitelio del intestino delgado (Devés and Boyd, 1998; Krehbiel and Matthews, 2003). Estas proteínas son CAT1 (Sistema y), ATBo, +(sistemaBo,+), bo,+AT y rBAT (sistema bo,+), y+LAT1, y+LAT2, y 4F2hc (sistema y+L) (Devés and Boyd, 1998; Krehbiel and Matthews, 2003).

Los aminoácidos cationicos (AAC; lisina, arginina, e histidina) son considerados para un óptimo crecimiento (Titgemeyer *et al.*, 1988; Merchen and Titgemeyer, 1992). Poco es conocido sobre la expresión de las proteínas por el epitelio del intestino delgado responsables para la absorción de lisina y otros AAC libres de la digesta (Moe *et al.*, 1987; Matthews, 2000). La expresión del ARNm de CAT1 ha sido identificado en el epitelio del intestino delgado en novillos (Liao *et al.*, 2008), mientras que la expresión de ARNm para los otros 6 proteínas transportadores de AAC no han sido identificados (Liao *et al.*, 2009).

Liao *et al.*, (2009) realizaron un trabajo en el cual caracterizaron el patrón de ARNm de los transportadores de AAC expresado por el crecimiento en ganado de carne en alimentados con una dieta a base de alfalfa. Este estudio demostró que incrementos de suplemento luminal de AA derivados de microbios ruminales reduce la capacidad de la membrana apical y basolateral para el transporte de AAC, ARNm del transportador de AAC representó la capacidad funcional.

En cultivos celulares el nivel de ARNm se incrementó (3 veces) en respuesta a la inanición por nivel de aminoácidos y permaneció alta 24 hrs alta (Hyatt *et al.*, 1997). Con

la información revisada existe la hipótesis que la expresión de ARNm de los transportadores de aminoácidos posiblemente esté relacionada con la tasa de síntesis de proteína muscular, por lo tanto esta expresión podría ser un indicador.

## **2.10 MIOSINA**

Los músculos estriados constituyen la mayor proporción del peso de los animales y el 80% es contabilizado por los dos tipos de proteína principal actina y miosina, que forma los fragmentos delgados y gruesos de las fibras musculares. La molécula de miosina consiste de dos cadenas pesadas (Sivaramakrishnan and Burke, 1982). Las dos cadenas pesadas de un peso molecular de 200,000 Da se encuentran unidas con 4 cadenas ligeras de un peso molecular de 17, 000 a 21, 000 Da. Ambas la cadena liviana y pesada exhibe un polimorfismo que son tejidos específicos y desarrollo de estados específicos. Miosina de cadena pesada o ligera están representadas en el genoma como familias de multigenes en varias especies incluyendo pollos, ganado vacuno, humanos, ratas, conejos y nematodos (Robbins *et al.*, 1982).

Los niveles de expresión del ARNm de MyoD1 y miogenina son representativo para el número de células satélites activas en músculos (Beilharz *et al.*, 1992), lo cual puede ser relacionado con la tasa de crecimiento muscular, por lo tanto estos genes pueden tener un mayor efecto sobre muscularidad y crecimiento (te Pas and Visscher, 1994). La expresión ARNm de Miosina, podría ser indicador de la síntesis de esta proteína.

Cuadro 1.- Sistema de transportadores de aminoácidos en mamíferos.

Sistema de transporte	Isoformas (cADNs clonados)	Mecanismo	Sustratos
A	ATA1 ATA2 ATA3	Cotransporte 1Na <sup>+</sup> /AA	Gly, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Asn, Met
asc	asc-1/4F2hc asc-2/(?)	Antiporte	Gly, Ala, Ser, Cys, Thr (D y L) Gly, Ala, Ser, Thr
ASC	ASCT1 ASCT2	Antiporte Na <sup>+</sup> - dependiente	Ala, Ser, Cys Ala, Ser, Cys, Thr, Gln
b <sup>0,+</sup>	b <sup>0,+</sup> AT/rBAT	Antiporte	Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys-
<b>B<sup>0</sup></b>	BOAT-1	Cotransporte 2Na <sup>+</sup> /AA	Leu, Ile, Gln, Phe, Ala, Pro, Cys, Val, Met, Ser, Asn, (His, Gly, Thr, Trp, Tyr)
B <sup>0,-</sup>	ATB <sup>0,+</sup>	Cotransporte 2Na <sup>+</sup> /1Cl <sup>-</sup> /AA	Ala, Ser, Cys, His, Met, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp, (Lys, Arg, Thr, Asn, Gln)
β (BETA)	GAT1 GAT2 GAT3 GAT4	Cotransporte 2-3Na <sup>+</sup> /1Cl <sup>-</sup> / AA	GABA GABA, betaína, Pro, β-Ala GABA, betaína, taurina GABA, betaína
Gly	GlyT1 GlyT2	Cotransporte 2-3Na <sup>+</sup> /1Cl <sup>-</sup> / AA	Gly Gly
IMINO	PAT1 PAT2 PAT3 (?)	Cotransporte 1H <sup>+</sup> /AA	Pro, Gly, Ala, β-Ala, AIB, GABA Pro, Gly, Ala, MeAIB ?
L	LAT-1/4F2hc LAT-2/4F2hc LAT-3	Antiporte	His, Met, Leu, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, (Gln) Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Leu, Ile, Val Leu, Ile, Val, Phe, Met
N	SN1 SN2	Cotransporte Na <sup>+</sup> /AA acoplado a H <sup>+</sup> -antiporte	Gln, Asn, His Gln, Asn, His, Ser, Gly
T	TAT1	Uniporte	Phe, Tyr, Trp,
XAG	EAAT1 EAAT2 (GLT1) EAAT3 EAAT4 EAAT5	Cotransporte 3Na <sup>+</sup> /1H <sup>+</sup> /AA acoplado a K <sup>+</sup> -antiporte	Glu, Asp Glu, Asp Glu, Asp, Cys Glu, Asp Glu, Asp
xc -	xCT/4F2hc	Antiporte	Glu, Cys-, (Asp)
<b>y<sup>+</sup></b>	CAT-1 CAT-2A/B CAT-3 CAT-4 (?)	Uniporte	Arg, Lys, His, O Arg, Lys, His, O Arg, Lys ?
<b>y+L</b>	y+LAT- 1/4F2hc y+LAT- 2/4F2hc	Antiporte 1Na <sup>+</sup> /AA	Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu, Ala, Cys

(Adaptado de Gasol, 2004)

## 2.11 AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA

Los aminoácidos de cadena ramificada son leucina, valina e isoleucina. Greenwood y Titgemeyer (2000), mostraron que metionina, histidina y al menos uno de los



aminoácidos de cadena ramificada fueron limitantes cuando la proteína microbial fue la fuente predominante de suplementación de AA en intestino delgado de novillos en crecimiento. Estos autores fueron los primeros que reportaron que los aminoácidos de cadena ramificada pueden limitar la retención del nitrógeno de ganado alimentado con dietas bajas en proteína no degradable en el rumen.

Leucina y valina, fueron aminoácidos limitantes en dietas a base de cascarilla de soya que fue baja en proteína no degradable ruminalmente en novillos en crecimiento (Loest, *et al.*, 2001). Por otra parte en una dieta basada en cebada-trigo-concentrado de proteína de soya, fue demostrado que valina es el primer limitante después de lisina, metionina, y treonina (Theil *et al.*, 2004).

Lordelo, *et al.*, (2008) evaluaron el efecto de la adición de isoleucina, valina o la combinación de los dos en dietas bajas en proteína en lechones. Encontrando que la suplementación de valina o la combinación con isoleucina con adecuados niveles de lisina, metionina, treonina y triptófano es necesario para lograr el máximo comportamiento en cerdos consumiendo dietas a base maíz-trigo-harina de soya.

Blomstrand *et al.* (2006) encontraron que el incremento en la disponibilidad de aminoácidos de cadena ramificada estimula la traducción de ARNms específicos en el músculo en humanos durante la recuperación de ejercicios de resistencia.

### **2.11.1 Leucina**

Es uno de los aminoácidos de cadena ramificada. Wilson *et al.* (2010), demostraron que la infusión parental de leucina activa al sistema activador de la síntesis de proteína mTOR y éste a la síntesis de proteína en músculo esquelético de cerdos neonatales, pero ésta también fue dependiente de la disponibilidad de aminoácidos. Suryawan, *et al.* (2008),

encontraron similar sensibilidad al incrementar los aminoácidos postprandial en cerdos neonatos y en particular leucina, este aminoácido incrementó la síntesis de proteína en vivo por incrementos en la activación del mTORC1 y se reduce por decrementos de esta.

El efecto de leucina en la activación de la síntesis de proteína parece estar asociada también a la concentración sérica de insulina. (Anthony, *et al.*, 2002). La disponibilidad de aminoácidos debe de ser importante en la fase inicial de la traducción del mensajero (Bohe´ *et al.*, 2003). Bohe´ *et al.*, (2001) encontraron que el incremento en la disponibilidad de aminoácidos en humanos incrementó la síntesis de proteína 30 minutos después de la infusión. Aunque leucina es el único aminoácido al que se le ha encontrado relación con la activación del complejo mTOR, la disponibilidad de otros aminoácidos debe influir en su activación.

Estudios en ratas muestran que los aminoácidos de cadena ramificada, especialmente leucina, estimulan la actividad del mTOR, la quinasa S6 y los factores de iniciación de la traducción (Kimball y Jefferson, 2004). La infusión de aminoácidos de cadena ramificada o solo leucina en periodos, de 2 a 6 horas, incrementó la fosforilación de la quinasa S6 y 4E-BP1 en músculo esquelético de humanos (Greiwe *et al.*, 2001). Aunque leucina no ejerce efecto en la unión del ARNm con el ARNt para metionina (met-ARNt) durante la fase inicial de la traducción, este aminoácido parece estimular la unión de los factores indicadores de la síntesis al ARNm. Crozier *et al.*, (2005) indican que leucina tiene un efecto estimulador en el ensamble del complejo IF4E, un componente clave en la unión del ARNm durante la iniciación de la traducción, evidenciado por la fosforilación de la proteína ligadora eIF4E (4E-BP1) y por la asociación de eIF4E con 4E-BP1 y eIF4G. En

general todos estos resultados indican que leucina afecta la cadena de señalización para la síntesis de proteína.

### ***2.11.2 Leucina en la activación del mTOR (activación de la síntesis de proteínas)***

La leucina participa en la síntesis de proteína, activando al mTOR (sitio blanco de la rapamicina) proteína que regula el inicio de la síntesis de proteína en respuesta a factores de crecimiento, nutriente y aminoácidos (especialmente leucina). Los aminoácidos son importantes en la señalización del mTOR. La síntesis de proteína en células de mamíferos es un proceso complejo. Tienen una serie de reacciones que involucran la asociación de las subunidades ribosomales 40S y 60S, el ARN mensajero, ARN metionil (met-ARN), cofactores (ej. GTP y ATP), y factores proteicos conocidos como factores de iniciación eucarióticos (eIF), factores de elongación, y factores de liberación. La traducción de ARNm ocurre en 3 fases: 1) Iniciación, el complejo que forma el eIF4E con el 4EBP1, hace que el eIF4E no sea reconocido, leucina a través de mTOR promueva la fosforilación del 4EBP1 liberando el eIF4E y permitiendo la formación del complejo eIF4E-mARN que se une al eIF4G y después al 40S ribosoma. Se piensa que mTOR es una kinasa que fosforila al 4EBP1 y a la S1K6 (fig. 1 y 2), ARN-met y ARNm se unen a la subunidad 40S ribosomal y el 40S ribosomal se une a la subunidad 60s para formar un complejo ribosomal capaz de realizar la traducción. 2) Elongación, el ARN de transferencia une aminoácidos e incorpora dentro del polipéptido en crecimiento acorde al molde el ARNm; 3) Terminación, donde la proteína completada es liberada del ribosoma (Vary and Lynch, 2006).

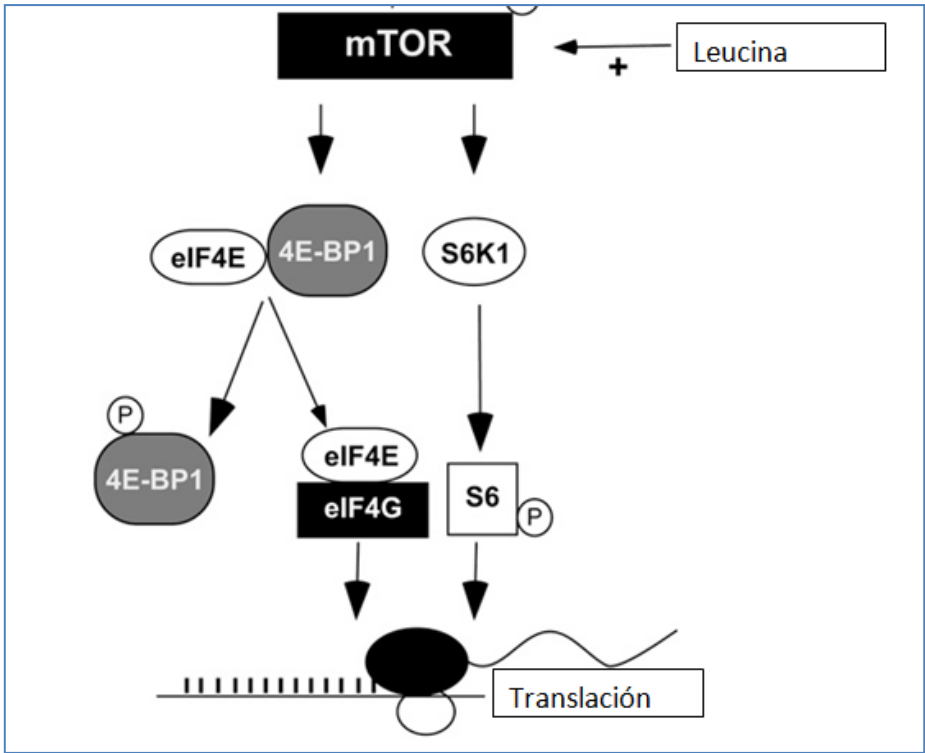


Figura 1.- Activación de mTOR por leucina(Vary and Lynch, 2006)

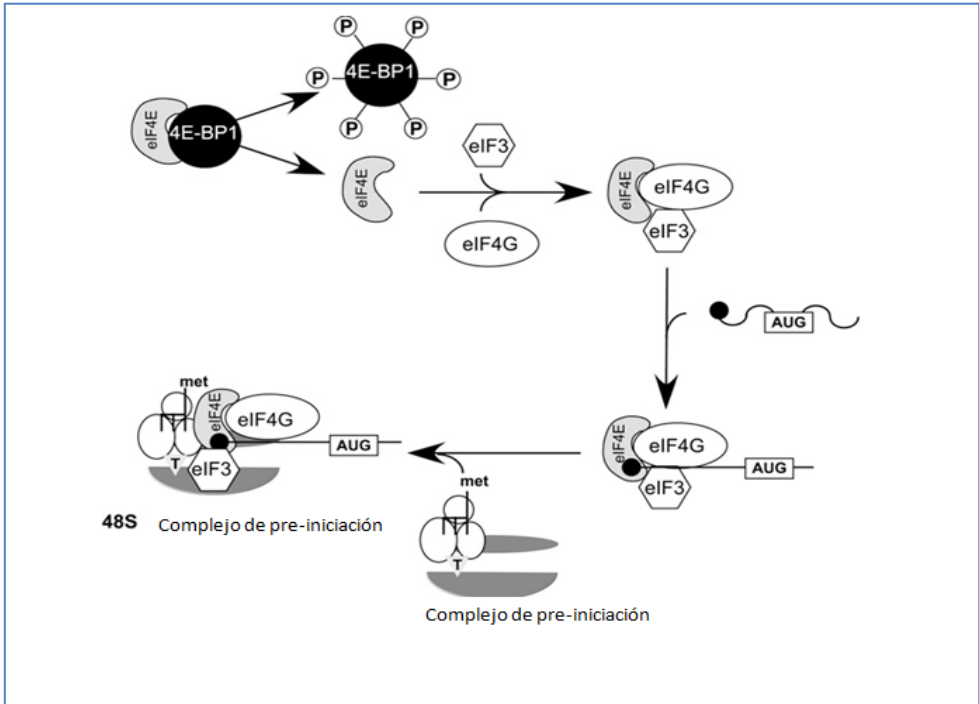


Figura 2.- Activación del mTOR por leucina, para formar el complejo de iniciación (Vary and Lynch, 2006)

Como una estrategia para reducir la contaminación por nitrógeno de suelos y aguas se ha propuesto reducir el contenido de proteína cruda en los alimentos mediante la reducción del porcentaje de soya en la dieta y la adición de aminoácidos sintéticos (lisina, treonina, y metionina). Sin embargo, de manera consistente, la respuesta de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína base maíz – o sorgo-pasta de soya, es inferior a la de animales que reciben dietas con niveles superiores de proteína cruda, a pesar de que en ambos casos satisfacen los requerimientos de todos los aminoácidos esenciales (Cervantes *et al.*, 1995). En contraste, 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 (Pichardo, *et al.*, 2003). Se especula que la disponibilidad de todos los aminoácidos a nivel celular y equilibrio entre estos sean factores determinantes de esas diferencias.

### **3. HIPOTESIS**

El comportamiento productivo y la expresión de los genes de miosina y proteínas transportadoras de aminoácidos (CAT y b<sup>0+</sup>) pueden ser afectados por el contenido de leucina y lisina en dietas a base de trigo en cerdos en crecimiento.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la adición de leucina y lisina a dietas a base de trigo en el comportamiento productivo y expresión de los genes de miosina y transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT y b<sup>0+</sup>).

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar las variables del comportamiento productivo de los animales a los cuales se les aplicó diferentes niveles de lisina y leucina en el alimento.

Determinar la expresión de los ARN mensajeros de los genes que codifican para miosina y para los transportadores de aminoácidos catiónicos CAT y b<sup>0+</sup>.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento se condujo en la Unidad Experimental Porcina del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. Se utilizaron 20 cerdos cruzados (Landrace-Hampshire-Duroc) de un peso promedio de  $16.4 \pm 1.7$  kg distribuidos en 4 grupos (tratamientos) de cinco animales, con base en edad, peso inicial y camada, cada tratamiento tenía cinco repeticiones (tres hembras y dos machos). Los 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 cada 7 días; el consumo de alimento, la conversión alimenticia y la ganancia diaria de peso también se registraron con esta frecuencia.

Los tratamientos fueron los siguientes: T1) dieta base con 95.64 % de trigo, contiene de lisina, treonina y metionina para cubrir los requerimientos, T2) igual al T1 + 0.35 % de lisina sintética, T3) T1 + 0.15% de leucina sintética, T4) T2 + 0.15% de leucina. El experimento tuvo una duración de 28 días. Se adicionó una mezcla de vitaminas y minerales para cubrir o exceder sus requerimientos para cerdos de 10-20 Kg, La composición de las dietas experimentales se muestra en Cuadro 2.

### **5.1 SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS**

A los 28 días los cerdos fueron sacrificados, se tomaron muestras aproximadamente 0.5 g de tejido que se colocaron en tubos de 2 ml previamente identificados, los tejidos fueron hígado, intestino delgado (yeyuno) y de los músculos largo dorsal y semitendinoso, los cuales se guardaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-85^{\circ}\text{C}$  para su posterior extracción de ARN, después de la extracción se continuó con la



transcripción reversa (RT) y la cuantificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR tiempo real), todo esto para cuantificar la expresión de genes de miosina y para los transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT y b<sup>0+</sup>) y correlacionarlo con los niveles de leucina en las dietas (0 y 0.15% de leucina sintética) .

## **5.2 ANALISIS DE LABORATORIO**

### ***5.2.1 Extracción del ARN***

La extracción del ARN, se realizó mediante la técnica de Trizol Reagent (Chomczynski and Sacchi, 1987). Se pulverizó 0.1 g de tejido en nitrógeno líquido, se agregó 1 ml de Trizol y se homogenizó, dejando reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. Después se añadió 0.2 ml de cloroformo, se mezcló y se dejó reposar por 2-3 min. Después se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, la fase acuosa fue transferida a un tubo estéril 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 un 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 µl de agua estéril, por último se corrió un gel de agarosa al 1.2% para verificar la integridad del ARN (Fig, 3). Todas las alícuotas fueron almacenadas a -85 °C.

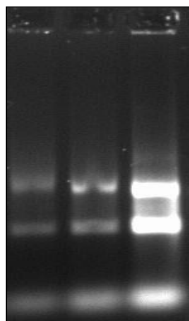


Figura 3. Integridad del ARN de Hígado, intestino y músculo.

### **5.2.2 Transcripción Reversa (RT)**

En un microtubo de 500  $\mu$ l se colocaron los siguientes reactivos: 5  $\mu$ l de ARN, 6  $\mu$ l de buffer 5x, 0.75  $\mu$ l de DNAsa de 0.1 U/ $\mu$ l (Invitrogen), 18.25  $\mu$ l de agua tratada con DEPC (agua libre de DNAsa/ARNsa), la reacción se incubó a temperatura ambiente 15 min y después 5 min a 70 °C, se agregó a la reacción 1  $\mu$ l de random primer 0.15  $\mu$ g/ml (Invitrogen), 1  $\mu$ l de DNP's 10  $\mu$ M, se incubó a temperatura ambiente 5 min, después se colocó en hielo mientras se añadió 2  $\mu$ l de buffer 5x, 3  $\mu$ l de DTT 0.1 M, 1  $\mu$ l de inhibidor de ARNsa 10 U/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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 -85 para continuar con la siguiente reacción.

### **5.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real)**

El ADNc amplificado 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 2). Los ARNms fueron

para músculo: Ribosomal 18S (Rib), Miosina (Mio), transportadores de aminoácidos (CAT y b<sup>0,+</sup>), en intestino delgado Rib, CAT, y b<sup>0,+</sup>, y en hígado Rib, CAT, b<sup>0,+</sup>.

En un espectrofotómetro a 260 nm se leyó la concentración de los ADNc obtenidos mediante el procedimiento de retrotranscripción descrito anteriormente. Con los valores de concentración obtenidos se realizaron diluciones de los ADNc para homogenizarlos a una concentración de 50 ng de ADNc/μl.

Para las reacciones de PCR cuantitativo se emplearon 50 ng de ADNc; oligonucleótidos específicos (sentido y antisentido), (Cuadro 3); a una concentración final de 0.10 μM de cada uno; se agregaron 12.5 μl de SYBR Green Supermix (Maxima™ SYBR Green/Rox qPCR Master Mix 2X, fermentas), esta mezcla contiene a la enzima ADN polimerasa, un buffer con MgCl y Sybr-green; la reacción fue completada a 25 μl con agua libre de nucleasas tratada con DEPC. Las temperaturas de alineación para la amplificación de los fragmentos de los ARNm fueron de 56 a 58 °C dependiendo de la T<sub>m</sub> (temperatura de fusión, es la temperatura a la cual la mitad del DNA se ha desnaturalizado, de la muestra que estamos calentando) de los oligonucleótidos utilizados y se realizaron con 45 ciclos de amplificación.

Para la realización de cada uno de los ensayos de PCR cuantitativo se agruparon los ARN mensajeros del mismo factor y tejido; además, en cada uno de los ensayos se amplificó un fragmento de 295 pares de bases de ARN ribosomal 18S como testigo de la calidad del ADNc. 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.

Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales

Ingrediente	Dieta			
	T1	T2	T3	T4
Trigo	95.72	95.72	95.72	95.72
Pasta de soya	-	-	-	-
Lisina	0.90	1.35	0.90	1.35
Treonina	0.28	0.28	0.28	0.28
Metionina	0.10	0.10	0.10	0.10
Almidón	0.60	0.60	0.60	0.60
Leucina	-	-	0.15	0.15
Carbonato de Ca	1.35	1.35	1.35	1.35
Ortofosfato	0.40	0.40	0.40	0.40
Sal	0.35	0.35	0.35	0.35
Vit. Min. Premix <sup>a</sup>	0.20	0.20	0.20	0.20
Antibiótico	0.10	0.10	0.10	0.10

a Proporcionó por kilogramo de dieta: Vitamina A, 4800 UI; vitamina D3, 800 UI; vitamina E, 4.8 UI; vitamina K3, 1.6 mg; riboflavina, 4 mg; d-ácido pantoténico, 7.2 mg; niacina, 16 mg; vitamina B12, 12.8 µg; Zn, 64 mg; Fe, 64 mg; Cu, 4 mg; Mn, 4 mg; Y, .36 mg; Se, .13 mg.

Cuadro 3.- Oligonucleótidos utilizados para PCR tiempo real.

Gen	Fragmento Sentido	Fragmento Antisentido	Tamaño Fragmento
CAT-4 AY371320	GTCGGTTGCAAAGACCATTT	GAGCGGTGCTGACAACAGTA	329 Kb
BO-2 EF127857	CGGAGAGAGGAUGAGAAGU	GCCCGCTGATGATGATGATGA	562 Kb
MIO-2 MN_001123141	AGAUUUCUGACCUGACUG	TCTCCCTCCATCTTCTTC	340 Kb
RIB-1 AY265350	GGCCTCACTAAACCATCCAA	TCTCCCTCCATCTTCTTCCTTC	295 Kb

#### 5.2.4 Análisis Estadístico

Este experimento se condujo con un diseño bloques completos al azar (Steel y Torrie, 1980) los datos se analizaron de acuerdo con el diseño utilizado y la comparación de medias se hizo mediante contrastes ortogonales y correlación (SAS, 1998).

Modelo:

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

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable dependiente.

$\mu$  = Media poblacional.

$T_i$  = Efecto del i-ésimo tratamiento.

$\beta_j$  = Efecto del j-ésimo bloque.

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental.

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

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Comportamiento productivo

El resultado del comportamiento productivo se presenta en el Cuadro 4. La interacción entre leucina y lisina fue significativa para ganancia de peso ( $P = 0.046$ ) y conversión alimenticia ( $P = 0.027$ ), y no hubo efecto significativo ( $P > 0.05$ ) para ninguno de los factores. Sin embargo, se detectó significancia estadística ( $P \leq 0.05$ ) en algunas variables cuando se comparó el efecto del nivel de cada aminoácido, manteniendo constante el nivel del otro. La adición de 0.15% de leucina a la dieta que no se adicionó con lisina cristalina (T1 vs. T3) redujo ( $P \leq 0.05$ ) la ganancia de peso, pero no hubo diferencia ( $P > 0.10$ ) cuando leucina se adicionó a la dieta adicionada con 0.35% de lisina (T2 vs. T4). Asimismo, la ganancia de peso tendió a incrementar ( $P \leq 0.10$ ) cuando se adicionó lisina a la dieta adicionada con 0.15% de leucina (T3 vs T4). La conversión alimenticia también se deterioró ( $P \leq 0.05$ ) con la adición de leucina sin lisina adicional (T1 vs T3), pero la adición junto de lisina mejoró ( $P \leq 0.05$ ) la conversión en la dieta adicionada con leucina (T3 vs. T4). El consumo de alimento no se afectó por la adición de ninguno de los aminoácidos a la dieta.

Estos datos coinciden con lo encontrado por Garcia *et al.* (2009) y Mendez *et al.*, (2009), quienes también observaron un efecto negativo en la ganancia de peso al incrementar el nivel de leucina en dietas elaboradas en base a trigo, suplementada con los aminoácidos limitantes, en cerdos en la etapa de crecimiento. En contraste, Suryawan, *et al.* (2008) encontraron que al incrementar niveles de leucina en cerdos neonatos incrementaba la síntesis de proteína. Sin embargo, es importante indicar que estos autores, a diferencia

de García *et al.* (2009) y Méndez, *et al.*, (2009), hicieron infusiones de leucina en lechones de 7 d de edad alimentados con leche materna y bajo condiciones de manejo y alimentación distintas a las que ocurren en la práctica.

Cuadro 4. Efecto de la adición de leucina (Leu) y lisina (Lis) a la dieta en la ganancia diaria de peso (GDP), consumo de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA) de cerdos en crecimiento alimentados con dietas a base de trigo.

	Aminoácido adicionado a dieta				E.E.	Efectos Principales, P =		
	0.0	0.0	0.15	0.15		Leu	Lis	Leu x Lis
Leucina, %	0.0	0.0	0.15	0.15				
Lisina, %	0.0	0.35	0.0	0.35				
GDP, g·d <sup>-1</sup> , a, c	0.607	0.560	0.492	0.573	0.064	0.098	0.575	0.046
CDA, kg·d <sup>-1</sup>	1.24	1.18	1.11	1.20	0.117	0.331	0.837	0.188
CA <sup>a, b</sup>	2.05	2.14	2.27	2.11	0.111	0.074	0.462	0.027

<sup>a</sup> Efecto de adición de leucina sin lisina adicional (T1 vs. T3):  $P \leq 0.05$

<sup>b</sup> Efecto de adición lisina con leucina adicional (T3 vs T4)  $P \leq 0.05$

<sup>c</sup> Efecto de adición lisina con leucina adicional (T3 vs T4):  $P \leq 0.10$

## 6.2 Expresión relativa de los ARNm

### 6.2.1 Expresión relativa de ARNm para b<sup>0,+</sup>

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de la expresión relativa de ARNm para b<sup>0,+</sup> en intesto delgado (yeyuno), músculos Largo Dorsal y Semitendinoso, e hígado. En intestino delgado (yeyuno) la adición de leucina redujo la expresión del gen ( $P = 0.002$ ), y no se observó efecto por adición de lisina ( $P = 0.738$ ) ni por la interacción leucina x lisina ( $P = 0.343$ ). En músculo largo dorsal aunque la adición de leucina tendió a reducir ( $P =$

0.066) y hubo un incremento por efecto de lisina ( $P = 0.018$ ) en la expresión de  $b^{0+}$ , la interacción de leucina x lisina fue significativa ( $P = 0.003$ ). En músculo semitendinoso ( $P = 0.921$ ) e hígado ( $P = 0.328$ ) no se observó efecto por leucina, aunque se presentó una reducción en la expresión de  $b^{0+}$  por la adición de lisina en este músculo ( $P = 0.012$ ) e hígado ( $P = 0.095$ ).

Al comparar el efecto individual de cada aminoácido (Cuadro 5), en yeyuno tendió a reducir ( $P \leq 0.10$ ) la expresión del ARNm de  $b^{0+}$  al adicionar leucina en dietas sin adicionar lisina sintética (T1 vs T3) y la redujo ( $P \leq 0.05$ ) en dietas adicionadas con 0.35% de lisina, (T2 vs T4). En músculo largo dorsal se incrementó ( $P \leq 0.05$ ) la expresión cuando se adicionó lisina sin adición de leucina (T1 vs T2), no hubo efecto ( $P > 0.05$ ) cuando se comparó la adición de lisina en dietas con adición de leucina (T3 vs T4), en contraste hubo una reducción ( $P \leq 0.05$ ) al adicionar leucina en dietas con adición de 0.35% de lisina (T2 vs T4), sin embargo no se encontró efecto ( $P > 0.05$ ) en las dietas donde se adicionó leucina en dietas sin adición de lisina (T1 vs T3). En músculo semitendinoso tendió ( $P \leq 0.10$ ) a reducir la expresión del gen cuando se adicionó lisina a dietas sin adición de leucina (T1 vs T2), y la redujo ( $P \leq 0.05$ ) al adicionar lisina a dietas donde se adicionó 0.15% de leucina (T3 vs T4). No se observó diferencias ( $P > 0.05$ ) al adicionar leucina a dietas sin (T1 vs T3) ni con la adición de 0.35% de lisina (T2 vs T4). En hígado hubo una reducción ( $P \leq 0.05$ ) de la expresión al adicionar lisina a dietas con adición de 0.15% de leucina (T3 vs T4), sin embargo no se encontraron diferencias ( $P > 0.10$ ) cuando se adicionó lisina sin leucina adicional (T1 vs T2).



Cuadro 5. Efecto de la adición de leucina (Leu) y lisina (Lis) en la expresión relativa del gen de la proteína transportadora de aminoácidos b<sup>0,+</sup> en intestino delgado (Yeyuno), músculo largo dorsal (MLD), músculo semitendinoso (MST) e Hígado de cerdos en crecimiento (unidades: relación moléculas de mRNA del b<sup>0,+</sup> y el 18S-rARN).

	Aminoácido adicionado a la dieta, %				E.E.	Efectos Principales, P =		
	0.0	0.0	0.15	0.15		Leu	Lis	Leu x Lis
Leucina	0.0	0.0	0.15	0.15				
Lisina	0.0	0.35	0.0	0.35				
Yeyuno <sup>d, e</sup>	184.3	248.6	43.4	12.1	48.5	0.002	0.738	0.343
MLD <sup>a, e</sup>	123.6	371.3	189.2	150.5	38.4	0.066	0.018	0.003
MST <sup>b, c</sup>	80.3	45.2	81.0	42.4	12.4	0.921	0.012	0.900
Hígado <sup>c</sup>	141.2	95.8	426.0	49.2	116.7	0.328	0.095	0.181

<sup>a</sup> Efecto de la adición de lisina, sin leucina adicional (T1 vs T2)  $P \leq 0.05$

<sup>b</sup> Efecto de la adición de lisina, sin leucina adicional (T1 vs T2)  $P \leq 0.10$

<sup>c</sup> Efecto de la adición de lisina, con leucina adicional (T3 vs T4)  $P \leq 0.05$

<sup>d</sup> Efecto de la adición de leucina sin lisina adicional (T1 vs T3)  $P \leq 0.10$

<sup>e</sup> Efecto de la adición de leucina con lisina adicional (T2 vs T4)  $P \leq 0.05$

### 6.2.2 Expresión relativa de ARNm para la proteína transportadora de aminoácidos catiónicos, CAT

En el cuadro 6 se presenta la expresión relativa del gen de la proteína transportadora de aminoácidos catiónicos (CAT) en los diferentes tejidos intestino delgado (yeyuno), músculo largo dorsal y semitendinoso, e hígado. En intestino delgado (yeyuno) no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) por los efectos de leucina, lisina y la interacción. En músculo largo dorsal hubo una tendencia a disminuir ( $P = 0.100$ ) la expresión de CAT por efecto de lisina y no tuvo efecto ( $P = 0.621$ ) por leucina, Pero en

músculo semitendinoso hubo incremento ( $P = 0.007$ ) y reducción ( $P = 0.023$ ) en la expresión por efecto de leucina, lisina, respectivamente. En hígado tuvo una reducción ( $P = 0.002$ ) efecto de leucina e incremento ( $P = 0.001$ ) por efecto de lisina, sin embargo se tuvo una interacción ( $P = 0.002$ ) entre los dos efectos.

Al hacer comparaciones por tratamientos individuales en la expresión de CAT (Cuadro 6), en yeyuno y músculo largo dorsal no se observaron diferencias ( $P > 0.05$ ) con la adición de leucina con (T2 vs T4) o sin lisina adicional (T1 vs T3) o adición de lisina con (T3 vs T4) o sin leucina adicional (T1 vs T2). En músculo semitendinoso se tuvo una reducción ( $P \leq 0.05$ ) al adicionar lisina sin adición de leucina (T1 vs T2), pero no hubo diferencias ( $P > 0.10$ ) cuando se adicionó junto con leucina (T3 vs T4), tendió a aumentar ( $P \leq 0.10$ ) en la expresión cuando se adicionó leucina a dietas sin lisina adicional (T1 vs T3), también se elevó la expresión ( $P \leq 0.05$ ) cuando se adicionó leucina con adición de de lisina (T2 vs T4). En hígado se tuvo un incremento ( $P \leq 0.05$ ) al adicionar lisina a dietas sin leucina adicional (T1 vs T2), en contraste no hubo diferencias ( $P > 0.10$ ) cuando se adicionó lisina con leucina adicional (T3 vs T4), hubo una reducción ( $P \leq 0.01$ ) al adicionar leucina a dietas adicionadas con lisina (T2 vs T4) y no se tuvo diferencias ( $P > 0.10$ ) al adicionar leucina a dietas sin adicionar lisina sintética (T1 vs T3).

Aumentando lisina en las dietas no tuvo efecto en yeyuno, pero en músculo largo dorsal y semitendinoso, aumentó y disminuyó, respectivamente, la expresión del ARNm de CAT. De acuerdo con Hyatt *et al.*, (1997) era de esperarse que con incrementos de los niveles de aminoácidos hubiera una disminución en la expresión de ARNm de CAT, aunque el trabajo realizado por estos autores fue en cultivos celulares condiciones diferentes a las de este experimento; ellos concluyeron que el nivel de ARNm se

incrementó en respuesta a la falta de aminoácidos y permaneció alta durante 24 hrs. También Liao *et al.*, (2009), observaron que al adicionar aminoácidos derivados de microbios, por infusión se redujo el transporte transmembrana del epitelio intestinal para los aminoácidos catiónicos, esto fue en ganado de carne alimentado con una dieta a base de alfalfa.

Cuadro 6. . Efecto de la adición de leucina (Leu) y lisina (Lis) en la expresión relativa del gen de la proteína transportadora de aminoácidos CAT en intestino delgado (Yeyuno), músculo largo dorsal (MLD), músculo semitendinoso (MST) e Hígado de cerdos en crecimiento (unidades: relación moléculas de mRNA del Cat y el 18S-rARN).

	Aminoácido adicionado a la dieta, %				E.E.	Efectos Principales, P =		
	0.0	0.0	0.15	0.15		Leu	Lis	Leu x Lis
Leucina	0.0	0.0	0.15	0.15				
Lisina	0.0	0.35	0.0	0.35				
Yeyuno	10.0	17.9	12.9	21.0	5.6	0.601	0.178	0.982
MLD	69.1	137.7	68.2	107.6	30.4	0.621	0.100	0.639
MST <sup>a, b, c</sup>	33.0	10.2	54.3	38.0	7.5	0.007	0.023	0.670
Hígado <sup>a, c</sup>	92.5	1914.9	36.2	312.0	202.4	0.002	0.001	0.002

<sup>a</sup> Efecto de la adición de lisina, sin leucina adicional (T1 vs T2)  $P \leq 0.05$

<sup>b</sup> Efecto de la adición de leucina sin lisina adicional (T1 vs T3)  $P \leq 0.10$

<sup>c</sup> Efecto de la adición de leucina con lisina adicional (T2 vs T4)  $P \leq 0.05$

### 6.2.3 Expresión relativa de ARNm para miosina

En el cuadro 7 se presenta la expresión relativa del gen de miosina en músculo largo dorsal y semitendinoso. No hubo interacción de lisina y leucina ( $P > 0.05$ ) para ninguno de los músculos. En músculo largo dorsal hubo una disminución por efecto de la adición de leucina ( $P = 0.000$ ) y lisina ( $P = 0.052$ ). En músculo semitendinoso hubo una reducción en la expresión de ARNm de miosina únicamente por efecto de leucina ( $P = 0.015$ ).

También en el cuadro 7, se compara el efecto del nivel de cada aminoácido manteniendo constante el nivel del otro, en músculo largo dorsal hay una reducción en la expresión de miosina ( $P \leq 0.05$ ) cuando se adicionó leucina sin lisina adicional (T1 vs T3) y también se observó una reducción ( $P \leq 0.05$ ) al adicionar leucina a dietas con adición de lisina (T2 vs T4). Por otra parte hubo un decremento ( $P \leq 0.05$ ) por la adición de lisina en dietas con 0.15% de leucina sintética (T3 vs T4), sin embargo no hubo diferencias ( $P > 0.10$ ) cuando se adicionó lisina a dietas sin adición de leucina sintética (T1 vs T2). En músculo semitendinoso se encontró una reducción en la expresión de miosina ( $P \leq 0.05$ ) cuando se adicionó leucina en dietas sin agregar lisina sintética (T1 vs T3), pero no se observaron diferencias ( $P > 0.10$ ) cuando se adicionó leucina y se agregó 0.35% de lisina (T2 vs T4). Se observó un incremento ( $P \leq 0.05$ ) cuando se adicionó lisina a dietas que contenían leucina sintética (T3 vs T4), pero no se encontraron diferencias ( $P > 0.10$ ) cuando se adicionó lisina a dietas sin leucina (T1 vs T2).

En las comparaciones por los tratamientos individuales, se observó una disminución ( $P < 0.05$ ) en la expresión de ARNm de miosina en músculo largo dorsal cuando se adicionó leucina en la dieta sin adición de lisina (T1 vs T3), y en músculo semitendinoso también

se encontró una reducción al adicionar leucina a dietas adicionadas con lisina (T2 vs T4). Analizando por efectos principales (efecto por leucina, lisina, y la interacción leucina x lisina) también existió una reducción en la expresión del ARNm de miosina cuando se adicionó leucina, lo cual demostró un decremento de la síntesis de proteína esto se contrapone con los resultados obtenidos por otros cuyos trabajos fueron realizados en condiciones diferentes: Anthony, *et al.*, (2001) realizaron un trabajo con ratas a las cuales se les infundió somatostatina y leucina en forma oral; Lynch *et al.*, (2003) realizaron una administración aguda de l-leucina (0.27, 0.54, 1.35, 2.7, or 5.4 g/dl) también utilizaron ratas; Lang, *et al.*, (2005), realizaron infusiones intraperitoneales de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* y la posterior administración oral de leucina.

Cuadro 7. Efecto de la adición de leucina (Leu) y lisina (Lis) en la expresión relativa del gen de miosina en músculo largo dorsal (MLD) y músculo semitendinoso (MST) de cerdos en crecimiento (unidades: relación moléculas de mRNA de Miosina y el 18S-rARN).

Aminoácido adicionado a la dieta, %								
Leucina	0.0	0.0	0.15	0.15		Efectos Principales, P =		
Lisina	0.0	0.35	0.0	0.35	E.E.	Leu	Lis	Leu x Lis
MLD <sup>a, c, d</sup>	358.9	333.8	173.5	12.5	43.2	0.000	0.052	0.142
MST <sup>b, c</sup>	146.8	146.0	59.7	115.4	21.0	0.015	0.215	0.197

<sup>a</sup> Efecto de la adición de leucina sin lisina adicional (T1 vs T3)  $P \leq 0.05$

<sup>b</sup> Efecto de la adición de leucina con lisina adicional (T2 vs T4)  $P \leq 0.05$

<sup>c</sup> Efecto de la adición de lisina, con leucina adicional (T3 vs T4)  $P \leq 0.05$

#### **6.2.4 Expresión relativa de ARNm para b<sup>0+</sup>, CAT y miosina, en intestino delgado yeyuno, MLD, MST e hígado, Tratamientos vs Testigo**

En el cuadro 8, se comparan todos los tratamientos contra el testigo, en la expresión del ARNm de b<sup>0+</sup> de intestino no se encontraron ( $P > 0.05$ ) diferencias al comparar el testigo con los tratamientos, mientras que para músculo largo dorsal hay un incremento ( $P \leq 0.01$ ) al adicionar lisina sin leucina adicional (T1 vs T2), para los demás tratamientos no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ). Para músculo semitendinoso no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en ninguno de los tratamientos. En hígado se encontró un efecto positivo ( $P \leq 0.05$ ) por la adición de leucina sin la adición de lisina (T1 vs T3).

En la expresión de ARNm de CAT para intestino y músculo largo dorsal no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) al comparar todos los tratamientos. En músculo semitendinoso existe una reducción ( $P \leq 0.05$ ) por la adición de 0.35% lisina sin adición de leucina (T1 vs T2), por otra parte tendió a incrementar la expresión de CAT ( $P \leq 0.10$ ) cuando se adicionó leucina y lisina cristalina (T1 vs T3), para T4 no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ). En hígado hubo un aumento en la expresión de CAT cuando se adicionó lisina sin la adición de leucina (T1 vs T2) y para los demás tratamientos en este tejido no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ).

En músculo largo dorsal se observó un efecto negativo ( $P \leq 0.05$ ) en la expresión de miosina por la adición de leucina sin lisina (T1 vs T3) y también ( $P \leq 0.01$ ) en dietas que se les adicionó leucina y lisina (T1 vs T4). En músculo semitendinoso se encontró una reducción ( $P \leq 0.01$ ) en la expresión de miosina al adicionar leucina sin lisina, en los otros tratamientos no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) al compararlos con el tratamiento testigo. De la figura 3 a la 5 se comparan los tratamientos con respecto al testigo en

músculo largo dorsal y semitendinoso, en la figura 3 la expresión del ARNm de b0+, fig. 4 CAT y fig. 5 miosina. En el cuadro 9 se muestra el número de moléculas por nanogramo de ADNc.

Cuadro 8.- Efecto de la adición de leucina (Leu) y lisina (Lis) en la expresión relativa del gen de proteínas transportadoras y miosina, en intestino delgado (yeyuno), músculo largo dorsal (MLD), músculo semitendinoso (MST) e hígado de cerdos en crecimiento (testigo vs tratamientos)<sup>1</sup>.

Tratamiento (T)	1	2	3	4
Leucina adicionada a la dieta, %	0.0	0.0	0.15	0.15
Lisina adicionada a la dieta, %	0.0	0.35	0.0	0.35
Yeyuno b <sup>0,+</sup>	1.00	1.67	0.19	0.07
MLD b <sup>0,+ a</sup>	1.00	3.49	1.61	1.54
MST b <sup>0,+</sup>	1.00	0.56	1.08	0.52
Hígado b <sup>0,+ b</sup>	1.00	0.74	3.81	0.31
Yeyuno Cat	1.00	1.87	1.23	2.23
MLD Cat	1.00	2.62	1.28	2.08
MST Cat <sup>d, e</sup>	1.00	0.31	1.61	1.16
Hígado Cat <sup>g</sup>	1.00	46.01	1.65	7.83
MLD Miosina <sup>b, c</sup>	1.00	1.00	0.53	0.05
MST Miosina <sup>f</sup>	1.00	0.96	0.41	0.78

<sup>1</sup> Relación de los tratamientos respecto al testigo

<sup>a</sup> Efecto de la adición de lisina (T1 vs T2) P≤0.01

<sup>b</sup> Efecto de la adición de leucina (T1 vs T3) P≤0.05

<sup>c</sup> Efecto de la adición de leucina y lisina (T1 vs T4)  $P \leq 0.01$

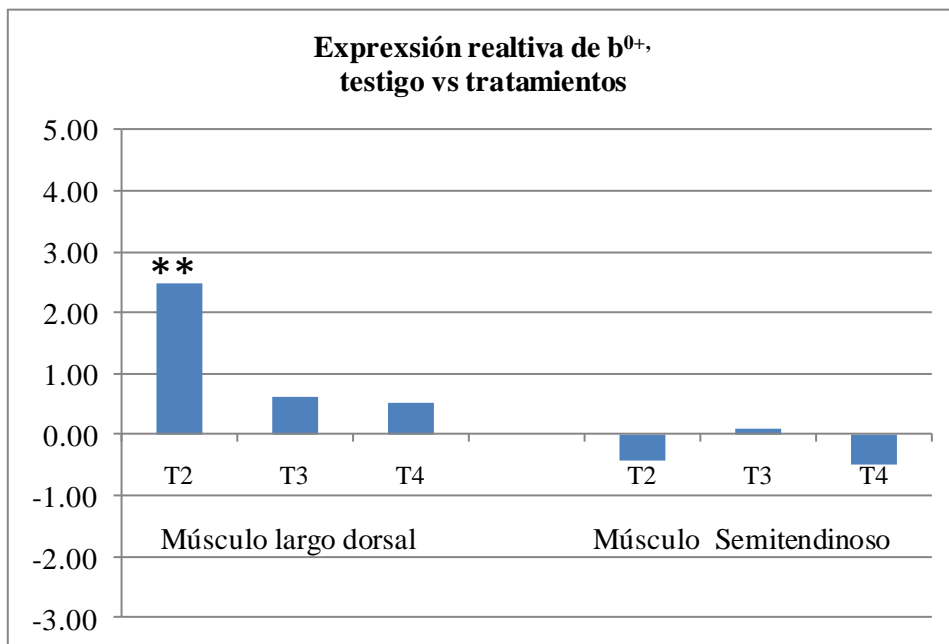
<sup>d</sup> Efecto de la adición de lisina (T1 vs T2)  $P \leq 0.05$

<sup>e</sup> Efecto de la adición de leucina (T1 vs T3)  $P \leq 0.10$

<sup>f</sup> Efecto de la adición de leucina (T1 vs T3)  $P \leq 0.01$

<sup>g</sup> Efecto de la adición de lisina (T1 vs T2)  $P \leq 0.10$

Figura 3. Comparación de la expresión relativa de  $b^{0+}$  en músculo largo dorsal y semitendinoso (Relación de los tratamientos respecto al testigo)

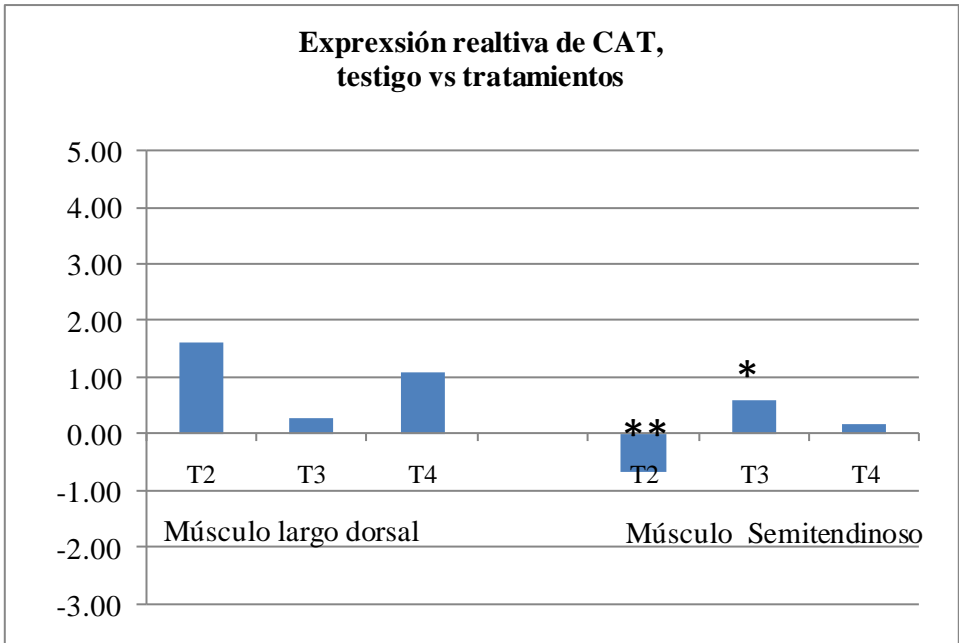


\*\*  $P \leq 0.05$

\* $P \leq 0.10$

Figura 4. Comparación de la expresión relativa de CAT en músculo largo dorsal y semitendinoso (Relación de los tratamientos respecto al testigo)

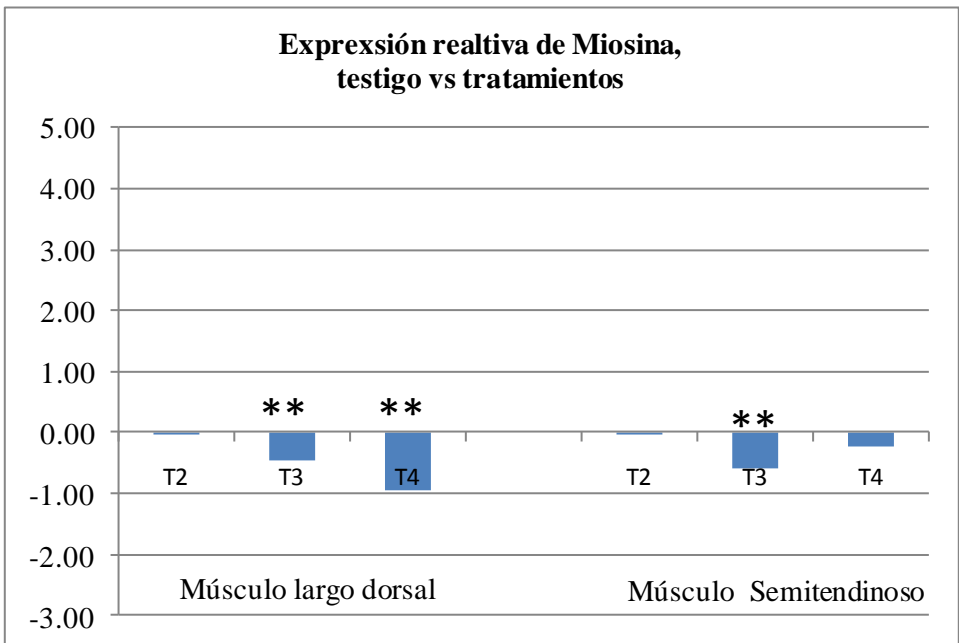




\*\*  $P \leq 0.05$

\* $P \leq 0.10$

Figura 5. Comparación de la expresión relativa de Miosina en músculo largo dorsal y semitendinoso (Relación de los tratamientos respecto al testigo, testigo = 0)



\*\*  $P \leq 0.05$

\* $P \leq 0.10$

Cuadro 9. Expresión de ARNm para b<sup>0+</sup>, CAT y miosina, en intestino delgado (yeyuno), músculo largo dorsal (MLD), músculo semitendinoso (MST) e hígado (moléculas por nanogramos de ADNc).

Tratamiento (T)	1	2	3	4
Leucina adicionada a la dieta, %	0.0	0.0	0.15	0.15
Lisina adicionada a la dieta, %	0.0	0.35	0.0	0.35
Yeyuno b <sup>0+</sup>	827433	349249	214338	99324
MLD b <sup>0+</sup>	1025167	1168539	1020600	883150
MST b <sup>0+</sup>	57892	67110	66340	36942
Hígado b <sup>0+</sup>	23404	23062	93554	35294
Yeyuno Cat	110740	87572	149368	288983
MLD Cat	561300	442089	562561	587215
MST Cat	24788	14768	23488	32705
Hígado Cat	16329	327589	9412	170732
MLD Miosina	2751300	2032711	1034730	21998
MST Miosina	142193	317723	75933	81277

En el cuadro 10 se muestra el análisis de correlación de la expresión de ARNm de las proteínas transportadoras de aminoácidos (b<sup>0+</sup> y CAT) en intestino delgado, músculo largo dorsal y semitendinoso y miosina en los mismos músculos, con la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia. La expresión de la proteína transportadora b<sup>0+</sup> en intestino delgado y músculo largo dorsal no tuvo relación ( $P > 0.05$ ) con ninguna de las variables (GDP y CA), pero hubo una tendencia ( $P \leq 0.10$ ,  $r = 0.469$ ) para músculo semitendinoso en relación con CA. En la expresión de CAT no se encontró relación ( $P > 0.05$ ) con ninguno de los tejidos. No se observó relación entre la expresión de miosina en músculo largo dorsal

( $P > 0.05$ ) con la GDP y CA en ninguno de los tejidos, pero en músculo semitendinoso se observó una tendencia ( $P \leq 0.10$ ,  $r = 0.445$ ) en GDP.

Cuadro 10. Análisis de correlación de proteínas transportadoras de aminoácidos ( $b^{0+}$  y CAT) y miosina, con ganancia de peso y conversión alimenticia.

	GDP ( $r^1$ )	Valor P <sup>2</sup>	CA (r)	Valor P
$b^{0+}$				
Intestino delgado	0.3090	0.2439	-0.35380	0.1788
Músculo largo dorsal	-0.1236	0.6485	0.03951	0.8845
Músculo semitendinoso	-0.3864	0.1393	0.46923	0.0667
CAT				
Intestino delgado	0.25781	0.3350	-0.41750	0.1076
Músculo largo dorsal	0.24813	0.3541	-0.1716	0.5251
Músculo semitendinoso	-0.3563	0.1755	0.17303	0.5216
Miosina				
Músculo largo dorsal	0.05484	0.8401	-0.0756	0.7809
Músculo semitendinoso	0.44521	0.0840	-0.1730	0.5216

<sup>1</sup> r = coeficiente de correlación

<sup>2</sup> P = valor de P obtenido de la prueba de correlación

En el cuadro 11, se muestra el análisis de correlación entre la expresión relativa de proteínas transportadoras de aminoácidos y la expresión de genes de miosina en músculo largo dorsal y semitendinoso. La expresión de la proteína transportadora  $b^{0+}$  en intestino delgado se correlacionó con la expresión de miosina de músculo largo dorsal ( $P \leq 0.05$ ), pero no con miosina en músculo semitendinoso ( $P > 0.05$ ), la expresión de  $b^{0+}$  en músculo largo dorsal y semitendinoso no presentó relación ( $P > 0.05$ ) con miosina en ninguno de los dos músculos. La expresión de CAT en intestino delgado y músculo largo dorsal no hubo relación ( $P > 0.05$ ) con miosina en músculo largo dorsal y semitendinoso. Tiende a haber una correlación ( $P \leq 0.10$ ) cuando la expresión de CAT en músculo semitendinoso es relacionada con miosina en músculo semitendinoso.

Cuadro 11. Análisis de correlación de proteínas transportadoras de aminoácidos en intestino delgado ( $b^{0+}$  y CAT), músculo largo dorsal y semitendinoso, con la expresión de miosina en músculo largo dorsal y semitendinoso.

	Miosina			
	Músculo largo dorsal ( $r^1$ )	Valor P <sup>2</sup>	Músculo semitendinoso ( $r$ )	Valor P
$b^{0+}$				
Intestino delgado	0.52059	0.0387	0.3924	0.1328
Músculo largo dorsal	0.25379	0.3429		
Músculo semitendinoso			-0.13305	0.6233
CAT				
Intestino delgado	-0.29931	0.2601	-0.37233	0.1556
Músculo largo dorsal	-0.007	0.9795		
Músculo semitendinoso			-0.45538	0.0763

<sup>1</sup>  $r$  = coeficiente de correlación

<sup>2</sup> P = valor de P obtenido de la prueba de correlación

Los resultados indican que hay una reducción en la síntesis de proteína al incrementar el nivel de leucina en las dietas, estos resultados son opuestos a los encontrados por varios autores (Anthony *et al.*, 2001; Lynch *et al.*, 2003; Lang and Frost, 2005; Dreyer *et al.*, 2008; Drummond *et al.*, 2008; Sreekumaran y Short, 2005; Liu *et al.*, 2006). Esta diferencia se atribuye al hecho de que los estudios referidos se realizaron en humanos, ratas o en condiciones diferentes a las que se tienen en animales de rápido crecimiento. Además, es probable que Leucina haya interactuado con Isoleucina o Valina durante su absorción intestinal o en su ingreso a la célula para la síntesis de proteína, debido a que los tres poseen una estructura química semejante (Liu *et al.*, 2006).

## 7. CONCLUSION

Al adicionar leucina a dietas a base de trigo adicionada con lisina, metionina y treonina para llenar los requerimientos en cerdos en crecimiento hay un efecto negativo en el comportamiento productivo, y a nivel celular con la expresión de los genes relacionados con la síntesis de proteína en las dietas adicionadas con leucina. Quizás esto se deba a que leucina interactuó con isoleucina y valina, ya que estos contienen una estructura química semejante y compitan por el transporte en el epitelio intestinal o para pasar la membrana celular, reduciendo así la síntesis de proteína.

## 8. LITERATURA CITADA

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. 4a edición. Trad. M. Durfo and M. Llobera Ediciones Omega. Pp 1463.
- Anthony J. C., C. H. Lang, S. J. Crozier, T. G. Anthony, D. A. Maclean, S. R. Kimball, and L. S. Jefferson. 2002. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1092–E1101.
- Anthony, J. C., T. G. Anthony, S. R. Kimball, and L. S. Jefferson. 2001. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J. Nutr.* 131:856S–860S.
- Argetsinger, L. S. | G. S. Campbell, X. Yang, B. A. Witthuhn, Olli Silvennoinen, J. N. Ihle, and C. Carter-Su. 1993. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor associated tyrosine kinase. *Cell*, Vol. 74, 237-244.
- 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.
- Beilharz, M. W., R. R. Lareu, K. L. Garrett, M. D. Grounds, and S. Fletcher. 1992. Quantitation of muscle precursor cell activity in skeletal muscle by Northern analysis of MyoD and myogenin expression: Application to dystrophic (mdx) mouse muscle. *Mol. Cell. Neurosci.* 3:326–331.

- Blomstrand. 2006. A Role for Branched-Chain Amino Acids in Reducing Central Fatigue. *Journal of nutrition*. The Journal of nutrition 2006;136 (1 Suppl):274S-6S
- Bohe J., J. F. A. Low, R. R. Wolfe, and M. J. Rennie. 2001. Latency and duration of human muscle protein synthesis during continuous infusion of amino acids. *J. Physiol.* 532:575-9.
- Bohe J., J. F. A. Low, R. R. Wolfe, and M. J. Rennie. 2003. Human muscle protein synthesis is modulate by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose response study. *J. Physiol.*, 552:315-24.
- Browne G. j. Proud C.G. 2002. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur J Biochem* 269: 5360-5368.
- Burrin, D. G., T. A. Davis, S. Ebner, P. A. Schoknecht, M. L. M. Fiorotto, and P. J. Reeds. 1997. Colostrum enhances the nutritional stimulation of vital organ protein synthesis in neonatal pigs. *J. Nutr.* 127:1284–1289.
- Cabrera J. L. and Sanchez A. H. 2001. *Biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud.* Departamento de bioquímica y biología molecular Universidad de Alcalá Madrid. Ed. Harcourt. Pp 469.
- Cervantes M., G. L. Cromwell and Stahly. 1995. Synthetic amino acid supplementation in the low protein grain sorghum-soybebean meal diet for pigs. *Cuban J. Agric. Sci.* 29:197.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.
- Crozier, S. J., S. R. Kimball, S. W. Emmenrt, J. C. Anthony, L. S. Jefferson. 2005. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J. Nutr.* 135: 376-82.

- Devés, R., and C. A. R. Boyd. 1998. Transporters for cationic amino acids in animal cells: Discovery, structure, and function. *Physiol. Rev.* 78:487–545.
- Dreyer, H.C., M.J. Drummond, B. Pennings, S. Fujita, E.L. Glynn, D.L. Chinkes, S. Dhanan S, E. Volpi, and B.B. Rasmussen. 2008. Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: E392–E400.
- 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.
- García, H., K. Minero, M. Cervantes, A. Morales, V. Méndez, A.B. Araiza, M. Barrera, P. Carrillo y D. Pérez. 2009. Nivel de proteína y adición de aminoácidos a dietas base trigo para cerdos en crecimiento.
- 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. P 5.
- Greenwood, R. H., and E. C. Titgemeyer. 2000. Limiting amino acids for growing Holstein steers limit-fed soybean hull-based diets. *J. Anim. Sci.* 78:1997–2004.
- 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.



- 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.
- 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.
- Hyatt, S., L. Aulak, M. Malandro, M. Kilberg, and M. Hatzoglou. 1997. Adaptive regulation of the cationic amino acid transporter- 1 (CAT-1) in Fao cells. *J. Biol. Chem.* 272:19951–19957.
- 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.
- Krehbiel, C. R., and J. C. Matthews. 2003. Absorption of amino acids and peptides. In *Amino Acids in Animal Nutrition*. 2nd ed. J. P. F. D’Mello, ed. CAB International, Wallingford, UK. Pages 41–70
- Lang, C. H., and R. A. Frost. 2005. Endotoxin disrupts the leucine signaling pathway involving phosphorylation of mTOR, 4E-BP1, and S6K1 in skeletal muscle. *J. Cell. Physiol.* 203:144–155.
- Lawrence, T. L. J., and V. R. Fowler. 1997. *Growth of Farm Animals*. CAB Int., Wallingford, Oxon, UK. 344 pp.
- Lewin, B. 2000. *Genes VII. DNA Replication*. OXFORD University Press. P 385.
- 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 steer. *J. Dairy Sci.* 92:1124–1135.
- Liao, S. F., E. S. Vanzant, J. A. Boling, and J. C. Matthews. 2008. Identification and expression pattern of cationic amino acid transporter-1 (CAT-1) mRNA in small intestinal epithelia of Angus steers at four production stages. *J. Anim. Sci.* 86:620–631.
- Liu, Z, W. Long, D. A. Fryburg, and E. J. Barrett. 2006. The Regulation of Body and Skeletal Muscle Protein Metabolism by Hormones and Amino Acids. *J. Nutr.* 136: 212S–217S.
- Loest, C. A., E. C. Titgemeyer, B. D. Lambert and A. M. Trater. 2001. Branched-chain amino acids for growing cattle limit-fed soybean hull-based diets. *J Anim Sci.* 79:2747-2753.
- Lordelo, M. M., A. M. Gaspar, L. Le Bellego and J. P. B. Freire. 2008. Isoleucine and valine supplementation of a low-protein corn-wheat-soybean meal-based diet for piglets: Growth performance and nitrogen balance. *J Anim Sci* 86:2936-2941.
- Lynch, C. J., B. Halle, H. Fujii, T. C. Vary, R. Wallin, Z. Damuni, and S. M. Hutson. 2003. Potential role of leucine metabolism in the leucine-signaling pathway involving mTOR. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285:E854–E863.
- Mathews, C. K., K. E. van Holde, K. G. Ahern. 2002. *Bio química*. 3a Edición. Benjamin / Cummings Publishing Company. Pp 1,368.
- Matthews, J. C. 2000. Amino acid and peptide transport system. In *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. J. P. F. D’Mello, ed. CAB International, Wallingford, UK. Pages 3–23.

- 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
- Merchen, N. R., and E. C. Titgemeyer. 1992. Manipulation of amino acid supply to the growing ruminant. *J. Anim. Sci.* 0:3238–3247.
- 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.
- Moe, A. J., P. A. Pocius, and C. E. Polan. 1987. Transport of l-amino acids by brush border membrane vesicles from bovine small intestine. *J. Dairy Sci.* 70:290–297.
- Murray, RK., D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell. 2000. *Bioquímica de Harper* 15a edición. Ed. El Manual Moderno. Pp 1041.
- NRC. 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. 10th ed. Natl. Acad. Press. Washington, DC.
- Paniagua, R., M. Nistal, P. Sesma, M. Alvarez, B. Fraile, R. Anadón, F. J. Sáez. 2007. *Biología Celular*. 3ª Edición. McGRAW-HILL. P. 100.
- Pichardo, A., M. Cervantes, M. Cuca, J. Figueroa, A. B. Araiza, N. Torrentera and M. Cervantes. 2003. Limiting aminoacids in wheat for growing-finishing pigs. *Interciencia* 28:287-291.
- Robbins, J., G. A. Freyer, D. Chisholm and T. C. Gilliam. 1982. Isolation of multiple genomic sequences coding for chicken myosin heavy chain protein. *J. Biol. Chem.* 257:549.
- Rodwell, V. W. metabolismo de nucleótidos de purina y pirimidina. En: *Bioquímica de Harper* (R. K. Murray, P. A. Mayes, D. K. Granner y V. W. Rodwell. 2001). Editorial el manual moderno, S. A. de C. V. P 443: 472.

- 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.
- SAS. 1998. SAS/STAT user's guide: Statistics. Release 6.03. SAS institute, inc., Cary, NC. 956 pp.
- Sclafani R. A. and T. M. Holzen. 2007. Cell Cycle Regulation of DNA Replication. *Annu. Rev. Genet.* 2007.41:237-280.
- Silver N., S. Best, J. Jiang and S. L. Thein. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7:33.
- Sivaramakrishnan, M. and M. Burke. 1982. The free heavy chain of vertebrate skeletal myosin subfragment I shows full enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 257:1102.
- Sreekumaran, K.N. and K. R. Short. 2005. Hormonal and Signaling Role of Branched-Chain Amino Acids. *J. Nutr.* 135:1547S–1552S.
- 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.
- Te Pas, M.F.W., K. H. de Greef, T. J. van den Bosch, F. L. Harders, and C.L.M. Gerritsen. 1998. Relationship between selection for increased growth rate and/or decreased fat deposition and growth hormone and Pit-1 mRNA levels in pigs. *B.A.S.E.* 2:18 (Abstr. G/M1).
- Theil, K. P., J. A. Fernández, and V. Danielsen. 2004. Valine requirements for maximal growth rate in weaned pigs. *Livest. Prod. Sci.* 88:99–106.

- Titgemeyer, E. C., N. R. Merchen, L. L. Berger, and L. E. Deetz. 1988. Estimation of lysine and methionine requirements of growing steers fed corn silage-based or corn-based diets. *J. Dairy Sci.* 71:421–434.
- Vary, T. C. and C. J. Lynch. 2007. Nutrient Signaling Components Controlling Protein Synthesis in Striated Muscle. *J. Nutr.* 137: 1835–1843.
- Wang X. and C. G. Proud. 2006. The mTOR Pathway in the Control of Protein Synthesis. *Physiology*, Vol. 21, No. 5, 362-369.
- Wilson, F. A., A. Suryawan, M. C. Gazzaneo, R. A. Orellana, H. V. Nguyen, and T. A. Davis. 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.
- Wullschleger S., R. Loewith, M. N. Hall. 2006. mTOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.