

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS



***ADICION DE ISOLEUCINA Y LEUCINA A DIETAS BASE TRIGO:
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
TRANSPORTADORAS DE AMINOÁCIDOS Y MUSCULARES EN CERDOS***

**TRABAJO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA

VIANEY MENDEZ TRUJILLO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

MEXICALI BAJA CALIFORNIA, MÉXICO NOVIEMBRE 2010.

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la adición de leucina (Leu) e isoleucina (Ile) a dietas base trigo en cerdos en crecimiento. Las variables evaluadas fueron: ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA), conversión alimenticia (CA); características de la canal (espesor de grasa dorsal, EGD; área del ojo de la costilla, AOC); y expresión de dos transportadores de AA (CAT1 y b0,+AT) y miosina (Mio). Se emplearon 24 cerdos de 15.9 ± 0.6 kg, distribuidos en cuatro tratamientos: T1 dieta base trigo; T2 dieta base más 0.5 % de Leu; T3 dieta base más 0.5 % de Ile; T4 dieta base más 0.5 % de Leu más 0.5% de Ile. Durante el experimento de 21 días, los cerdos se pesaron semanalmente, al final se sacrificaron cuatro animales por tratamiento para evaluar las canales y tomar muestras de mucosa intestinal y músculos (largo dorsal, MLD; y semitendinoso, MST). Por efecto de Ile ($P=0.071$) y en comparación con la dieta base, la GDP se redujo al adicionar Leu ($P=0.033$), Ile ($P=0.025$) o ambas ($P=0.020$). El CDA y CA no se afectaron por la adición de Ile o Leu ($P>0.10$). No se observaron cambios en EGD y AOC en las canales por la adición de Leu e Ile o ambas en la dieta. Con respecto a la dieta base, en mucosa intestinal se redujo ($P=0.012$, $P=0.001$, $P=0.004$) la expresión relativa de b0,+AT por efecto de la adición de Ile, Leu y ambos respectivamente, mientras que la expresión de CAT1 se incrementó al adicionar Ile y Leu solas, o en combinación ($P<0.05$, $P<0.001$ y $P<0.001$, respectivamente). La expresión relativa de miosina en MLD incremento a por la adición de Ile y con la combinación de ambas ($P<0.05$ en ambas); pero disminuyó en MST ($P<0.0001$) debido a la adición de Ile de manera individual y en combinación con Leu. La adición de Ile y Leu solas o combinadas en la dieta de cerdos en crecimiento reduce su GDP y altera la expresión de los transportadores de AA en mucosa intestinal, y de miosina en MST y MLD, sin afectar el EGD y AOC de cerdos en crecimiento.

SUMMARY

The effect of adding leucine and isoleucine to wheat-based diets for growing pigs was evaluated. The response variables were: average daily gain (ADG), daily feed intake (FI), and feed conversion (FG), carcass traits (back fat depth, BF; loin eye area, LEA), and expression of two amino acid (AA) transporters (CAT1 and b^{0,+}AT) and myosin (Mio). Twenty four pigs, initial body weight of 15.9 ± 0.6 kg, randomly distributed in four dietary treatments according to a Randomized Complete Block design, were used. Treatments (T) were: T1, basal wheat-based diet fortified with --% Lys, --% Thr, --% Met; T2, basal plus 0.50% Leu; T3, basal plus 0.50% Ile; T4, basal plus 0.50% Leu and 0.50% Ile. Pigs were weighed in a weekly basis during the 21 d trial; at the end, four pigs per treatment were sacrificed to evaluate the carcass traits, and to collect samples from intestinal mucosa and two muscles (*Longissimus*, LDM; and *Semitendinosus*, STM). As compared to the basal diet, ADG gain reduced because of the addition of Leu (P=0.071), Ile (P=0.025), or both (P=0.020). FI and FG as well as the Carcass traits were not affected by the individual or combined addition of any of these AA (P>0.10). Expression of b^{0,+}AT in intestinal mucosa was reduced by Leu (P=0.001), Ile (P=0.012), or both (P=0.004). In contrast, CAT1 expression increased by adding Leu (P<0.001), Ile (P<0.05), or both (P<0.001). Relative expression of Mio in LDM increased because of Ile alone or in combination with Leu (P<0.05); but reduced in STM (P<0.001). These results show that Leu and Ile, alone or in combination in wheat-based diets, reduce ADG and affect the expression pattern of AA transporters and myosin in muscles, but have no effect on carcass traits of growing pigs.

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	4
INDICE DE CUADROS.....	7
INDICE DE FIGURAS.....	7
1.- INTRODUCCIÓN.....	8
2.- REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Eficiencia productiva en cerdos.....	9
2.2 Importancia de proteínas musculares.....	12
2.3 Transportadores responsables en la absorción de aminoácidos....	13
2.3.1 Transportador catiónico de aminoácidos (CAT1).....	15
2.3.3 Transportador catiónico de aminoácidos (b ⁰ ,+AT).....	15
2.3.4 Miosina de cadena pesada (MyH4).....	16
2.4 Importancia de aminoácidos de cadena ramificada (aarc) en Síntesis de proteínas en músculo.....	17
2.5 Mecanismos involucrados en la síntesis de proteínas.....	18
2.6 Complejo mTOR en la regulación de síntesis de proteínas.....	19
2.7 Aminoácidos y mTOR en la síntesis de proteínas.....	20
3.- HIPÓTESIS.....	24
4.- OBJETIVO.....	25
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	26

5.1 Sacrificio y toma de muestra.....	27
5.2 Análisis de laboratorio.....	29
5.3 Extracción de ARN.....	29
5.4 Retrotranscripción (RT).....	30
5.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR-tr)...	31
5.6 Análisis estadístico.....	32
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1 Comportamiento productivo.....	34
6.2 Parámetros de la calidad de la canal	
6.2.1 Espesor de la grasa dorsal y Área de la Costilla.....	35
6.3 Expresión de transportadores de aminoácidos	
6.3.1 Expresión de b0,+AT y CAT1 en yeyuno.....	37
6.3.2 Expresión de b0,+AT y CAT1 en hígado, músculo largo dorsal y musculo semitendinoso.....	40
6.3.3 Expresión de Mio en músculo largo dorsal y musculo semitendinoso.....	41
6.3.4 Expresión de IGF en hígado, musculo largo dorsal y musculo semitendinoso.....	44
7.- CONCLUSIONES.....	45
8.-LITERATURA CITADA.....	46
9.-ANEXO.....	60

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Sistema de transporte de aminoácidos en mamíferos.....	14
Cuadro 2. Composición de dietas experimentales.....	28
Cuadro 3. Oligonucleótidos para PCR-tr.....	33
Cuadro 4. Efecto de la adición de leucina-isoleucina, en comportamiento productivo (GDP, CDA,CA)	35
Cuadro 5. Efecto de la adición de leucina-isoleucina, en características de la canal.....	36
Cuadro 6. Expresión relativa de genes transportadores CAT1, b0,+AT en yeyuno.....	38
Cuadro 7. Expresión relativa del gen Mio en músculo largo dorsal y músculo semitendinoso.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del complejo mTOR	20
Figura 2. Aminoácidos y mTOR en síntesis de proteína.....	23

1 INTRODUCCIÓN

Los animales únicamente pueden sintetizar ciertos aminoácidos (AA) que son requeridos para sus funciones metabólicas y procesos biológicos, a éstos se les denomina AA indispensables. Un óptimo suministro de AA es necesario para garantizar la síntesis de proteínas, las cuales desempeñan papeles primordiales en todos los procesos biológicos (Young *et al.*, 1994). Además se ha visto que algunos AA de cadena ramificada, (leucina, isoleucina, valina), pudieran regular la transcripción y síntesis de proteínas (Fox *et al.*, 1998; Anthony *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han enfocado a evaluar los requerimientos de ciertos aminoácidos (lisina, leucina, arginina y metionina) en animales a nivel experimental y en ratas o en humanos empleando modelos *in vitro* (Bohe' *et al.*, 2003 y Crozier *et al.*, 2005). Por lo que es necesario evaluar en modelos más reales el impacto que tiene la adición de aminoácidos como isoleucina y leucina en la síntesis y expresión de proteínas transportadoras de aminoácidos y musculares; así como su efecto en la producción animal.

2. Revisión de literatura

2.1 Eficiencia productiva en cerdos

En México, durante los últimos 40 años, la porcicultura ha experimentado cambios muy profundos, durante los 70's ocupaba el primer lugar en el abasto nacional de carnes, sin embargo actualmente se ubica en el tercer sitio a nivel nacional (Moral-Barrera *et al.* 2007); uno de los principales factores que han contribuido a este fenómeno se relaciona con las crisis recurrentes de la economía, donde los productores se vieron fuertemente afectados en sus finanzas e ingresaron a las carteras vencidas de los bancos, situación que les obligó a abandonar sus granjas o asociarse con empresas altamente tecnificadas (Moral-Barrera *et al.*, 2007). Adicionalmente, la apertura comercial de México implica que el sector porcino mexicano se enfrenta a un mercado internacional que presenta tres características principales: 1) productores altamente eficientes, que les permite reducir sus costos de una forma dinámica; 2) productores con altos niveles de apoyos y subsidios directos e indirectos, que provocan excedentes artificiales de productos que no son consumidos en los países de origen y que saturan los mercados internacionales, trayendo consigo el desplome de los precios; 3) mercados fuertemente protegidos a las importaciones. Lo anterior implica que los productores realicen reducciones de costos e incrementos de la eficiencia productiva como un esfuerzo para alcanzar los niveles de competitividad necesarios para mantenerse en un mercado con las características descritas, pero

con apoyos sustancialmente menores y con minúsculas o nulas protecciones a la importación (Nava-Navarrete *et al.*, 2009). Entre las alternativas que los productores han recurrido para la obtención de una mejor eficiencia productiva se puede mencionar: a) la obtención de líneas genéticas precoces con mejores índices de conversión de alimento, y b) la obtención de cerdos con canales mucho más magras. Adicionalmente, a estos factores se han desarrollado diversos trabajos con diferentes fuentes de alimentos para mejorar el rendimiento productivo.

En la alimentación de cerdos en México se emplea la pasta de soya, sorgo y maíz como los principales ingredientes de las dietas (Teran-Mendoza *et al.*, 2004); sin embargo, aún cuando la composición química de los ingredientes ha sido publicada por instituciones como la NRC (1988) y el INRA (1985), su composición nutritiva varía de acuerdo a las diferentes variedades cultivadas, almacenaje, condiciones climáticas y agronómicas en las cuales se producen, así como a los métodos de procesamiento de los alimentos (ej. pasta de soya) (Metayer *et al.*, 1993). Adicionalmente, existe una gran dependencia de la importación de cereales de los Estados Unidos y otros países para la elaboración de los alimentos balanceados para animales (Terán *et al.*, 2004). Esto ha generado el desarrollo de estrategias alimenticias utilizando recursos y materias primas que, por sus requerimientos agroecológicos, compitan económicamente en condiciones más ventajosas con los cereales y la soya importados, haciendo posible su uso en la sustitución, total o parcial, de éstos últimos recursos, y permitiendo generar un producto a menor costo con ingredientes nacionales (González, 1994).

Independientemente, de la fuente de los ingredientes que se emplee en la alimentación de animales, y especialmente de los cerdos; estos deben estimular una mejor asimilación de nutrientes (glucosa y aminoácidos) hacia la síntesis de proteína muscular favoreciendo la hipertrofia del tejido (aumento en el tamaño de la fibra muscular) (Williams *et al.*, 1994); y suplementar con algunos aminoácidos como la lisina, considerada como uno de los principales aminoácido limitantes en la alimentación del cerdo, de acuerdo con los componentes mayoritarios de la dieta (Bikker *et al.*, 1994). Con el uso de dietas formuladas con base en sorgo y pasta de soya, puede provocarse relaciones inadecuadas de aminoácidos respecto a lisina, tal es el caso de treonina y la relación treonina: lisina. Treonina es el segundo aminoácido limitante en ambos ingredientes, y su digestibilidad promedio es menor a la de lisina. La síntesis de tejido depende de la corrección de los niveles de lisina digestible ileal verdadera y del resto de los aminoácidos de acuerdo al concepto de "Proteína Ideal" (Bikker *et al.*, 1994; Apple *et al.*, 2004).

En síntesis en la alimentación de cerdos se deberá:

- Emplear alimento balanceado en nutrientes.
- Suministrar a cada categoría o estado fisiológico el alimento que cubra sus necesidades nutritivas.
- Ajustar la relación entre energía, proteína y aminoácidos, especialmente lisina.

2.2 Importancia de las proteínas musculares

El músculo esquelético representa del 30 al 65% del peso corporal del cerdo de acuerdo a las razas consideradas, y contiene el 45% de las proteínas totales del individuo (Shriver *et al.*, 2000). Las fibras musculares constituyen el 75-90% del volumen muscular y el resto está integrado por tejido adiposo, tejido conectivo, vasos y nervios (Lefaucheur *et al.*, 1989). El aumento de la masa muscular está determinado por hipertrofia e hiperplasia. La hiperplasia que consiste en incremento en el número de células, en el tejido muscular ocurre principalmente durante la etapa embrionaria; mientras que la hipertrofia, definida como el aumento del tamaño de la célula, ocurre después del nacimiento (Koochmaraie *et al.*, 2002).

El crecimiento muscular es determinado por la relación entre síntesis y degradación de proteína, esto da lugar a la hipertrofia muscular. El aumento en la síntesis de proteína muscular se produce en respuesta a varios factores entre los que se incluye la ingesta de alimentos, que resulta en mayor disponibilidad de aminoácidos y otros nutrientes, así como a la síntesis y liberación de hormonas (ej. insulina) que inducen la activación de las rutas de señalización intracelular (Lawrence y Fowler, 1997).

Para que ocurra el crecimiento tanto en músculo como en otros tejidos es importante que los nutrientes, y en especial los AA encuentren disponibles en el torrente sanguíneo para ser transportados al interior de la célula.

2.3 Transportadores responsables en la absorción de aminoácidos

Los aminoácidos ingresan a las células y tejidos mediante un sistema de transportadores activos que reconocen, unen y transportan a los aminoácidos permitiéndoles el paso a través del dominio hidrofóbico de la membrana plasmática desde el medio extracelular hacia el interior de la célula (Christensen H., 1990). Los sistemas de transporte de aminoácidos se clasifican de acuerdo a: i) el tipo de aminoácido transportado y ii) su dependencia del ión sodio. De ahí que, la nomenclatura adoptada para identificar a los sistemas transportadores de aminoácidos 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). La excepción es el sistema L, que es sodio independiente y que por razones históricas se designa con mayúsculas (Christensen, 1990; Bröer, 2006). En la actualidad el desarrollo de herramientas moleculares (estudio del genoma humano y de Expressed Sequence Tags, ESTs) han permitido hacer búsquedas por homología de secuencia de las proteínas, que han contribuido a identificar un mayor número de transportadores de aminoácidos en diferentes especies, y a avanzar en su conocimiento y clasificación (cuadro 1).

Cuadro 1.- Sistema de transportadores de aminoácidos en mamíferos. Los sustratos de los aminoácidos se presentan en código de tres letras (Cys:cistina, O:orinitina, GABA: ácido γ -aminobutírico, AIB: ácido aminoisobutírico, MeAIB: ácido metil-aminobutírico). Los sustratos con menor afinidad se muestran entre paréntesis. (ζ) No claramente asignado. Adaptada y utilizada de Broër y Wagner (2002).

Sistema de transporte	Isoformas (cADNs clonados)	Mecanismo	Sustratos
A	ATA1 ATA2 ATA3	Cotransporte 1Na ⁺ /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 ⁺ - dependiente	Ala, Ser, Cys Ala, Ser, Cys, Thr, Gln
b ^{0,+}	b ^{0,+} AT/rBAT	Antiporte	Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys-
B ⁰	B ⁰ AT-1	Cotransporte 2Na ⁺ /AA	Leu, Ile, Gln, Phe, Ala, Pro, Cys, Val, Met, Ser, Asn, (His, Gly, Thr, Trp, Tyr)
B ^{0,-}	ATB ^{0,+}	Cotransporte 2Na ⁺ /1Cl ⁻ /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 ⁺ /1Cl ⁻ /AA	GABA GABA, betaina, Pro, β -Ala GABA, betaina, taurina GABA, betaina
Gly	GlyT1 GlyT2	Cotransporte 2-3Na ⁺ /1Cl ⁻ /AA	Gly Gly
IMINO	PAT1 PAT2 PAT3 (?)	Cotransporte 1H ⁺ /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 ⁺ /AA acoplado a H ⁺ -antiporte	Gln, Asn, His Gln, Asn, His, Ser, Gly
T	TAT1	Uniporte	Phe, Tyr, Trp,
X ^{AG}	EAAT1 EAAT2 (GLT1) EAAT3 EAAT4 EAAT5	Cotransporte 3Na ⁺ /1H ⁺ /AA acoplado a K ⁺ -antiporte	Glu, Asp Glu, Asp Glu, Asp, Cys Glu, Asp Glu, Asp
X _c ⁻	xCT/4F2hc	Antiporte	Glu, Cys-, (Asp)
y ⁺	CAT-1 CAT-2A/B CAT-3 CAT-4 (?)	Uniporte	Arg, Lys, His, O Arg, Lys, His, O Arg, Lys ?
y ⁺ L	y+LAT-1/4F2hc y+LAT-2/4F2hc	Antiporte 1Na ⁺ /AA	Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu, Ala, Cys

2.3.1 Transportador catiónico de aminoácidos (CAT1)

Las proteínas CAT (transportadores de aminoácidos cationicos) fueron los primeros transportadores de aminoácidos identificados en células de mamíferos a nivel molecular y representan la principal ruta de entrada de estos aminoácidos a las células, aunque en ciertas situaciones pueden reducir el flujo de su sustrato reduciendo la presencia de aminoácidos catiónicos en el interior de las células. Las proteínas CAT1 forman una subfamilia denominada acarreadora de soluto 7 (SLC7) que consiste de cuatro proteínas transportadoras de aminoácidos catiónicos: CAT-1 (SLC7A1), CAT-2A (SLC7A2A), CAT-2B (SLC7A2B), y CAT-3 (SLC7A3). Además, se conocen otras dos proteínas, SLC7A4 y SLC7A14 cuya función actualmente es desconocida (Closs, 2002). CAT1 es parte del sistema de transporte γ^+ , principal vía de entrada de aminoácidos catiónicos en células endoteliales.

2.3.3 Transportador catiónico de aminoácidos ($b^0,+AT$)

Este sistema de transportadores constituyen la gran mayoría de los transportadores de aminoácidos en mamíferos. Preferentemente, intercambian aminoácidos no esenciales por aminoácidos esenciales, permiten generar asimetrías, clave para el flujo vectorial de aminoácidos. En contraste a la proteínas transportadoras CAT1, los sistemas $b^0,+AT$ y $B^{0,+}$ (transportadores Na^+ dependientes para aminoácidos catiónicos y neutros) actúan en conjunto con el sistema basolateral dependiente γ^+L que regulan el transporte de aminoácidos a través de células epiteliales, necesarias para un adecuado proceso de absorción/reabsorción (Bauch *et al.*, 2003). Por otra parte, diversos estudios

indican la participación de los aminoácidos catiónicos en la síntesis de proteínas y reacciones enzimáticas dependientes, tal es el caso del proceso de síntesis de óxido nítrico (NO), urea, creatinina y agmatina (amina sintetizada a partir de la arginina); así como en la síntesis de poliaminas, prolina y glutamina. Estos procesos dependientes de aminoácidos catiónicos también sugieren una dependencia de su correcta absorción a través de sus sistemas de transporte específicos (Closs *et al.*, 2004).

2.3.4 Miosina (MyH4)

El tejido muscular se caracteriza por presentar células especializadas en la contracción. Cada una de estas células o fibras está compuesta por filamentos gruesos y finos. Los filamentos gruesos se componen de una proteína denominada miosina; (miosina de cadena pesada y de cadena liviana), (Barton *et al.*, 1987). Los filamentos finos consisten de proteína: actina, troponina y tropomiosina. La contracción muscular ocurre por interacción entre los filamentos finos y gruesos (Barton *et al.*, 1987).

El músculo esquelético en animales está integrado por tres tipos de fibras: I, HA, y IIB; un cuarto tipo IIC aparece en aquellos animales en crecimiento. Cada una de ellas tiene características propias tales como velocidad de contracción, diámetro, y vías metabólicas diferentes para la utilización del sustrato durante la contracción muscular (López-Rivero, 1993).

Te Pas *et al.* (1998) mencionan que el peso del músculo está relacionado con el número de fibras, que se producen durante el desarrollo embrionario (miogénesis)

cuando está bajo el control de la familia génica de MyoD integrada por; miogenina, MyoD1, Myf-5 y 6-Myf (Olson 1990; Weintraub *et al.*, 1991). Miogenina tiene un papel crucial durante la miogénesis, ya que su expresión se relaciona con la diferenciación de los mioblastos. Por tanto, miogenina podría tener una influencia en el número de fibras musculares y en la tasa de crecimiento de masa muscular (Te Pas, *et al.*, 1998).

2.4 Importancia de aminoácidos de cadena ramificada (aarc) en la síntesis de proteínas.

Los aminoácidos que tienen la capacidad de estimular la síntesis de proteínas son principalmente la leucina, isoleucina y valina, de estos la leucina es considerada como el aminoácido con mayor capacidad de estimulación de la síntesis de proteínas. Lo anterior fue demostrado por Anthony *et al.* (2001) quienes observaron que el consumo de leucina, isoleucina y valina, en ratas estimulaban una mayor síntesis de proteínas y traducción de RNAm *in vivo*. Siendo estadísticamente más significativo en los animales alimentados con leucina, posiblemente como resultado de un incremento en la fosforilación del eIF4E1y 4EBP1 en comparación con los animales testigos. Similares resultados fueron obtenidos por Escobar *et al.* (2005) quienes demostraron que el incremento de leucina en plasma estimula la síntesis de proteínas en musculo esquelético de cerdos neonatos principalmente a través de un incremento en los factores eIF4E y 4EBP1, confirmando que la leucina puede actuar como una molécula señal en la síntesis de proteínas en neonatos. Fox *et al.* (1998) sugieren que isoleucina y valina también puede activar factores de iniciación de la traducción, pero en menor

grado que leucina. Russell *et al.*, (1987), Figueroa *et al.*, (2003), indicaron que la adición de valina a una dieta baja a base de maíz-pasta de soya suplementada con triptófano, treonina y en algunos casos metionina, aumenta de consumo de alimento y ganancia diaria de peso pero no mejora la eficiencia alimenticia en cerdos en crecimiento.

2.5 Mecanismos involucrados en la síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas en células de mamíferos es un proceso complejo que implica una serie de reacciones que involucran la asociación de las subunidades 40S y 60S ribosomal, RNA mensajero (RNAm), el iniciador metionil-RNA transferencia ($\text{met-RNAt}_i^{\text{met}}$), amino acil-RNAs, cofactores (GTP y ATP) y proteínas conocidas como factores eucarióticos de iniciación (eIF), factores de elongación y factores de liberación que permiten la traducción del RNAm a proteínas (Alberts *et al.*, 2004). El proceso de traducción o síntesis de proteínas ocurre en tres principales pasos: 1) iniciación, en donde el $\text{met-RNAt}_i^{\text{met}}$ y RNAm se enlazan a la subunidad 40S y 60S ribosomal para formar el complejo ribosomal en donde se realizará la traducción; 2) elongación, proceso en el cual los aminoácidos forman un complejo con el RNAt y al interactuar con la información del RNAm forman una cadena de polipéptidos específico; 3) terminación, fase en la cual la proteína sintetizada es liberada del ribosoma (Gautsch *et al.*, 1998).

Durante la traducción del RNAm se deben considerar dos pasos que limitan el proceso: el primer paso es la formación del complejo de pre-iniciación, 43S, a partir de la sub-unidad ribosomal 40S y el $\text{met-RNAt}_i^{\text{met}}$, mediado por el factor

eucariótico de iniciación 2 (eIF2), y regulado por la actividad de su proteína de enlace eIF2B (Gautsch *et al.*, 1998); el segundo paso limitante involucra el reconocimiento, formación y acoplamiento del RNAm al complejo de pre-iniciación, catalizado por una sub-unidad del complejo del factor eucariótico de iniciación 4F (eIF4F) (Sonenberg, 1994). De esta forma, la traducción del RNAm es un proceso complejo que requiere una batería de proteínas (factores de traducción) que indirectamente pudieran ser controlados por los aminoácidos.

2.6 Complejo mTOR en la regulación de síntesis de proteínas

La proteína blanco de rapamicina denominada mTOR, es una quinasa que regula múltiples procesos de señalización incluyendo la síntesis de proteínas en respuesta a factores de crecimiento, nutrientes y aminoácidos (especialmente leucina y arginina) (Cook y Morley, 2007). mTOR, además, tiene la capacidad de enlazar diversas proteínas y formar dos tipos de complejos conocidos como mTORC1 (mTOR complejo 1) y mTORC2 (Wullschleger *et al.*, 2006). El mTORC1 es inhibido por la rapamicina y regulado por aminoácidos, caso contrario con el mTORC2, del cual actualmente no existe mucha información. El complejo mTORC1 (Fig.1) está constituido por las subunidades: (i) mTOR; ii) proteína Sec13 letal de mamíferos 8 (mLST8) llamada también Gβ; (iii) sustrato rico en prolina Akt de 40 kD (PRAS40); y (iv) la sub-unidad Raptor conteniendo a la molécula WD40. Raptor actúa como un agente acoplante en donde se localizan proteínas de enlace (4EBP1) y la quinasa ribosomal S6 (S6K1), con el complejo mTORC1 (Laplante *et al.*, 2009)

Se ha demostrado que los nutrientes, y específicamente los AA de cadena ramificada participan en la vía de señalización de mTOR; donde mTOR provoca la fosforilación de la treonina 389 (Thr389) de la proteína quinasa S6K1, es un paso crítico en la activación de la síntesis de proteínas (Kimball,2002).

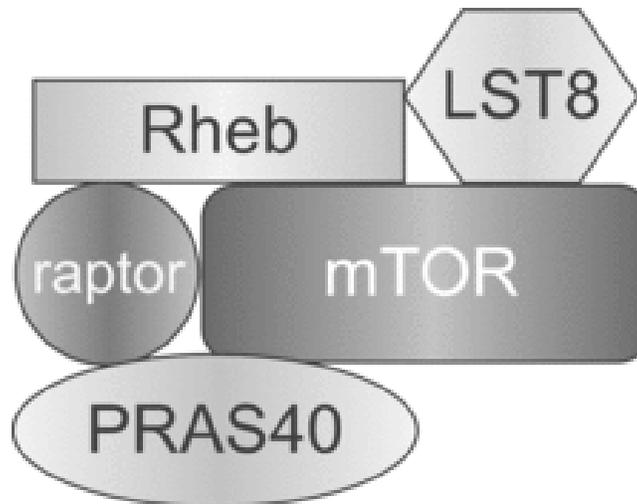


Figura 1. Estructura del complejo mTOR

2.7 Aminoácidos y mTOR en la síntesis de proteínas

Los AA's son considerados como factores clave en la regulación de la síntesis de proteínas. Éstos no solo proporcionan sustrato para la síntesis sino que también estimulan una serie de señales que regulan la traducción del RNAm (Vary y Lynch, 2007). 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 AA's es importante en la fase inicial de la traducción del mensajero (Bohe´ *et al.*, 2003). Sin embargo los mecanismos o proteínas sensores

que regulan el efecto de leucina en el complejo mTOR no se conocen claramente (Anthony et al., 2001).

Xia *et al.* (2003), mencionan la participación de otros AA, como glutamina en la síntesis de proteína en miocitos cardiacos de ratas recién nacidas; esos autores observaron que las ratas tratadas con mayores dosis de glutamina estimularon una respuesta celular asociada con un incremento en la expresión del gen de la adenilsuccinato sintetasa de musculo (ADSS1), el cual está relacionado con la generación del AMP cíclico, requerido para la señalización del mTOR.

Reportes recientes indican que leucina y glutamina tienen efectos opuestos, lo anterior fue observado por Deldicque *et al.* (2008), quienes registraron un incremento del estado de fosforilación de mTOR y mayor síntesis de proteínas al emplear leucina, mientras que glutamina disminuyó el estado de fosforilación de mTOR.

En el caso de otros AA, Yao *et al.* (2008) encontraron que la dieta rica en arginina estimula la fosforilación en mTOR y 4EBP1 en cerdos recién nacidos, favoreciendo la síntesis de proteínas principalmente en músculo esquelético. Otros AA tales como metionina, fenilalanina y triptófano no presentan ningún efecto, mientras que lisina, histidina y treonina presentan un efecto inhibitorio en la fosforilación de S6K1 en diferentes células de mamíferos, indicando lo complejo que resultan los procesos de señalización en los que están involucrados los AA en el mecanismo de síntesis de proteínas vía mTOR (Mayer and Grummt, 2006).

En cerdos en crecimiento se han realizado estudios, en los que se han evaluado isoleucina y valina, para determinar el balance del nitrógeno (Lordelo *et al.*, 2008). En otros trabajos se ha estudiado si la adición de leucina en la dieta tiene efecto sobre la expresión de genes transportadores de aminoácidos y la síntesis de proteína (Anthony *et al.*, 2001; Lynch *et al.*, 2003). Una observación importante es que muchos de estos estudios se realizaron en humanos, ratas o en condiciones de laboratorio altamente controlados, diferentes a las condiciones en que se encuentran los animales en producción, como los que se evaluaron en este trabajo. Por el contrario, García *et al.* (2009), evaluaron dietas bajas en proteína adicionadas con AA limitantes, y no encontraron respuesta a Leu; esto pudiera deberse a la interacción con Ile, provocando que la activación de la enzima BCAA descarboxilasa, la cual destruye también a isoleucina y valina (Wiltafsky *et al.*, 2010). La incorporación de isoleucina a dietas base trigo, es una opción que podría contrarrestar el efecto del exceso de leucina, y corregir la deficiencia que en ésta pudiera generarse por su destrucción.

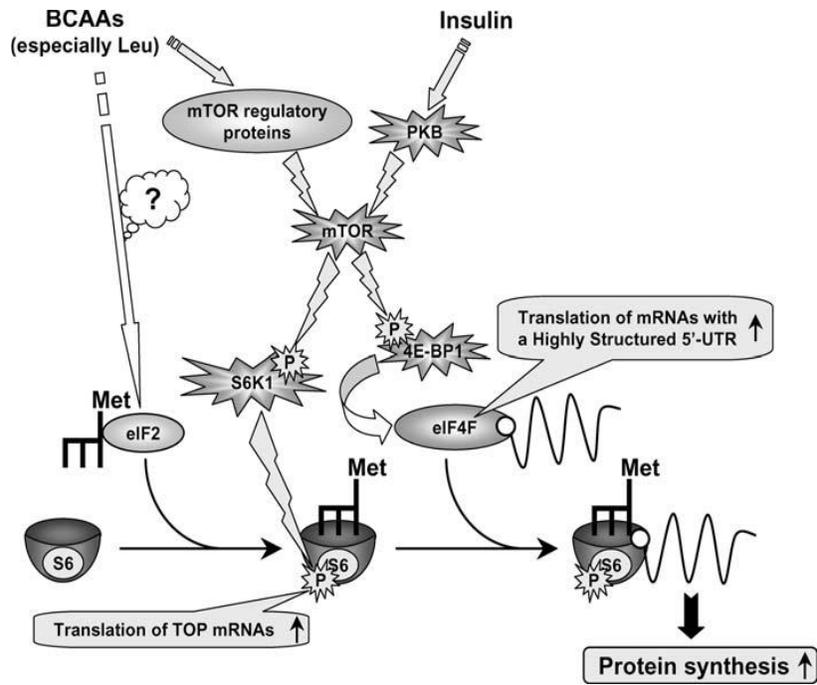


Figura 2. Aminoácidos y mTOR en la síntesis de proteína.

3 HIPÓTESIS

1. La deficiencia de isoleucina provocada en dietas ricas en Leucina puede corregirse con su adición en forma cristalina.
2. La suplementación con isoleucina puede mejorar el comportamiento productivo y las características de la canal de los cerdos.
3. Isoleucina modifica la expresión de genes transportadores de aminoácidos (CAT1, b0,+AT), miosina de cadena pesada 4 (MyH4), y factor de crecimiento similar a insulina (IGF), relacionados con la síntesis de proteína muscular.

4 OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto de la adición de isoleucina en dietas base trigo enriquecidas con leucina, en el comportamiento productivo y las características de la canal de cerdos en crecimiento
2. Evaluar el efecto de la adición de isoleucina en dietas base trigo enriquecidas con leucina, en la expresión de genes transportadores de aminoácidos (CAT1, b0,+AT), miosina de cadena pesada (MyH4) y factor de crecimiento similar a insulina (IGF) de cerdos en crecimiento.

5. MATERIALES Y METODOS

El trabajo de investigación se dividió en dos fases, la primera consistió en una prueba de comportamiento con cerdos en crecimiento para evaluar parámetros productivos (ganancia diaria de peso, conversión alimenticia y consumo diario de alimento), y características de la canal (espesor de grasa dorsal y área del ojo de la costilla), y la segunda fase consistió en evaluar el efecto de la dieta sobre la expresión de genes de transportadores de aminoácidos (CAT1, b0,+AT), factor de crecimiento similar a insulina (IGF) así como miosina (Mio); en tejidos de yeyuno, hígado, músculo largo dorsal (MLD) y músculo semitendinoso (MST), de los animales en experimentación.

La prueba de comportamiento se llevó a cabo en la Unidad de Fisiología y Metabolismo de Cerdos del Instituto de Ciencias Agrícolas, UABC. Se emplearon 24 cerdos cruzados (Landrace x Hampshire x Duroc), con 15.9 ± 0.6 kg de peso vivo inicial, distribuidos en cuatro tratamientos con base en su peso inicial, sexo, edad y camada, y de acuerdo con un diseño de Bloques completos al azar, con seis repeticiones por tratamiento. Los animales se alojaron en corraletas individuales con piso elevado, equipadas con comedero de tolva y bebedero tipo chupón; el alimento y agua se ofrecieron a libre acceso. Los cerdos se pesaron al inicio y a los 7, 14 y 21 días del experimento para estimar la ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA). La duración del experimento fue de 21 días. Al finalizar el experimento se sacrificaron cuatro cerdos de cada tratamiento para la toma de muestras de tejidos a emplearse para análisis de expresión de genes.

Las dietas de los tratamientos (T) se formularon con trigo como único ingrediente mayor. Se utilizó un mismo lote de trigo cultivado por irrigación en todas las dietas. Los tratamientos fueron los siguientes: T1) dieta base adicionada con 0.69% Lis, 0.27% Tre y 0.10% Met; T2) como en T1 más 0.50% Leu; T3) como en T1 más 0.50% Ile; T4) como en T1 más 0.50% Leu y 0.50% Ile. Todas las dietas se adicionaron con Lis, Tre y Met cristalina y proveían el resto de los AA esenciales, vitaminas y minerales en cantidades suficientes para cerdos en el rango de 10 a 20 kg de peso vivo (NRC, 1998). Las dietas experimentales se muestran en el cuadro 2.

5.1 Sacrificio y toma de muestra

Al día 21 del inicio de la fase experimental se llevo a cabo el sacrificio de 16 animales (cuatro por cada tratamiento) que participaron en la evaluación, éste fue realizado en el Taller de Carnes de este Instituto de Ciencias Agrícolas. Inmediatamente al sacrificio se colectaron muestras de aproximadamente 0.5 g de: hígado, del lado izquierdo del animal se tomaron las muestras de músculo largo dorsal (entre la costilla 10 y 11), así como músculo semitendinoso, y mucosa intestinal de yeyuno (previo lavado con solución salina al 1%). Las muestras se colocaron en microtubos de 2 ml previamente identificados. El proceso anterior se realizó a en condiciones de asepsia en cuanto fue posible, se utilizó material estéril, todos los instrumentos empelados durante el muestreo fueron lavados continuamente con etanol al 100%; las muestras de tejidos fueron colocadas en nitrógeno líquido para su traslado al laboratorio en donde se conservaron en un ultracongelador a -86°C, para estudios posteriores.

Un día posterior al sacrificio de los animales, y con la canal fría, se realizó la medición del espesor grasa dorsal (EGD) y área de ojo de la costilla (AOC), partiendo del costillar derecho de cada uno de los animales sacrificados. Las mediciones se hicieron entre las costillas, 9-10 y 11-12. El EGD se midió con una regla en cm, mientras que para el AOC se utilizó un sistema de estandarización que consiste en una cuadrícula de plástico (AMSA, 2001), contando los puntos que caen dentro del límite que se desea medir en (pulgadas²).

Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales.

Ingredientes (%)	Dietas			
	Base	+Leu	+Ile	+Leu+Ile
Trigo	95.35	95.35	95.35	95.35
L-Lisina HCl	0.88	0.88	0.88	0.88
L-Treonina	0.27	0.27	0.27	0.27
DL-Metionina	0.1	0.1	0.1	0.1
L-Leucina	-	0.5	-	0.5
L-Isoleucina	-	-	0.50	0.5
Almidón de maíz	1.00	0.50	0.50	-
Carbonato de Ca	1.35	1.35	1.35	1.35
Ortofosfato	0.40	0.40	0.40	0.40
Sal iodada	0.35	0.35	0.35	0.35
Vitaminas y Minerales ²	0.20	0.20	0.20	0.20
Antibiótico	0.10	0.10	0.10	0.10

Dietas: Base, dieta trigo + 0.69% Lis, 0.27% Tre y 0.1% Met; +Leu, Base + 0.50% Leu; +Ile, Base + 0.50% Ile; +Leu+Ile, 0.50% Leu + 0.50% Ile. Proporcionó por kg de dieta: Vit. A, 17,500 IU; Vit. D, 200 IU; Vit. E, 11 IU; niacina, 12.5 mg; ácido pantoténico, 9 mg; folacina 0.3 mg, riboflavina, 3.0 mg; piridoxina, 1.5 mg; vit. K, 0.5 mg; biotina, 0.5 mg; vit. B₁₂, 15 mg; Zn, 80 mg; Cu, 5 mg; Fe, 80 mg; Mn, 3 mg; I, 0.14 mg; Se, 0.25 mg.

5.2 Análisis de laboratorio

Los análisis de laboratorio se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC. Las muestras de los tejidos, fueron procesadas para realizarles una extracción de ARN, seguido de retrotranscripción (RT) de los mismos; y por último mediante reacciones cuantitativas de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR-tr) se amplificaron y cuantificó la expresión relativa de los RNA mensajeros para los genes transportadores de aminoácidos CAT1 y b_{0,+AT} en mucosa intestinal (yeyuno), y miosina, en músculo largo dorsal y semitendinoso. De la misma forma se realizaron extracciones del RNA total de hígado, duodeno e íleon, sin obtener amplificación de los RNAm del transportador catiónico de aminoácidos (CAT1 y b_{0,+AT}) e IGF (factor de crecimiento similar a insulina) al hacer la PCR-tr.

5.3 Extracción de ARN

La extracción del ARN, se realizó haciendo algunas adaptaciones de la técnica de TRIZOL Reagent (Chomczynski y Sacchi, 1987), las adaptaciones consistieron en modificar la temperatura y tiempo de incubación de las muestras. Se tomó aproximadamente 0.1 g de muestra de tejido congelado y se macero en un mortero frío hasta obtener polvo fino adicionando nitrógeno líquido. El polvo obtenido se colocó sin dejar descongelar en un microtubo frío de 2 ml adicionando 1000 µl de Trizol mezclando suavemente por inversión, posteriormente se centrifugó a 4°C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf), durante 10 minutos a 10000 rpm. La fase líquida se pasó a un microtubo de 2 ml, y se incubó por 5

minutos en hielo, posteriormente se agregaron 200 μ l de cloroformo frío, se agitó vigorosamente e incubó por 2 minutos en hielo antes de centrifugar a 4 °C a 10,000 rpm por 15 minutos. La fase superior del tubo se transfirió a un microtubo de 2 ml en hielo, adicionando 500 μ l de isopropanol frío, y se dejó reposar por 10 minutos en hielo. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se decantó y se recuperó la pastilla de ácido nucleico que fue lavada con 1000 μ l de etanol al 100% frío, y se volvió a centrifugar a 8500 rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente se decantó el etanol recuperándose la pastilla que fue secada durante 15 minutos a temperatura ambiente y resuspendida en 30 μ l de agua tratada con DEPC. Para confirmar la presencia y calidad del RNA total, se analizaron 5 μ l del producto en un gel de agarosa al 1 %, con 8 μ l de bromuro de etidio, (2.5E-3mg/ml).

5.4 Retrotranscripción (RT)

La reacción se llevó a cabo con la enzima transcriptasa reversa RT-Superscript III (Invitrogen, USA), de la siguiente manera: en un microtubo de 500 μ l se colocaron 6 μ l de buffer 5x, 5 μ l ARN, 0.75 μ l de DNA, y cbp 30 μ l con agua tratada con DEPC, la reacción se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, y a 70 °C durante 5 minutos. Se agregó a la reacción 1 μ l de random primer 3 μ g/ μ l, 1 μ l de nucleótidos (DNTP's) a concentración de 10 μ M de cada uno, y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente en hielo; se añadieron 2 μ l de buffer 5x, 3 μ l de DTT 0.1 M, 1 μ l de inhibidor de ARNsa 10U/ μ l, se centrifuga para

homogenizar la reacción. A continuación la reacción, se incubó a 42 °C por 2 minutos, y se añadió 1.5 µl de la enzima transcriptasa reversa (RT-Superscript III, Invitrogen; o M-MLV, Fermentas) 200 U/µl, y se incubó a 42 °C por 50 minutos y a 70°C durante 15 minutos. Al final el producto de la retrotranscripción se almacenó a -20 °C.

5.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR-tr)

Para esta reacción se diseñaron y probaron oligonucleótidos para cada uno de los ARNm tomando en cuenta la secuencia de los genes de interés, la estandarización de estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (modelo Eppendorf) de punto final con temperatura de alineación y concentración del cofactor MgCl₂ correspondiente (Cuadro 3). Los ARNm analizados fueron en músculo largo dorsal y semitendinoso: Miosina; en intestino delgado e hígado: transportadores de aminoácidos (CAT1 y b0,+AT e IGF), en cada reacción se considero el ARNm del Ribosomal 18S (Rib 18S), como el gen constitutivo, finalmente se corrió en un gel de agarosa al 1%, con 2.5E-3mg/ml de bromuro de etidio, en 20 ml de TBE, para corroborar así la presencia del fragmento del gen de interés.

La concentración de cDNA obtenido se determinó en un espectrofotómetro (Thermo electron), con una lectura de absorbancia a 260 nm de longitud de onda (A₂₆₀) y su estimación a través de la fórmula: [ADN] ng/µl= (A₂₆₀ *OD * Factor de dilución), usando la densidad óptica (OD) para el ADN de 50 y un factor de dilución de 200. (Sambroock y Russell, 2001).

Las reacciones de PCR-tr, se hicieron por duplicado, se iniciaron con 50 ng/μl de cDNA de cada muestra y tejido específico, 0.75 μM de oligonucleótidos específicos para cada ARNm, 12.5 μl de SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) y cbp 25 μl con agua tratada con DEPC. Se utilizó una curva estándar de ARN Ribosomal que también se empleó como gen constitutivo para normalizar el resultado de las reacciones. El equipo empleado para los análisis de PCR-tr o cuantitativo fue un Chromo4 acoplado a una máquina DNA-Engine (Bio Rad), y el programa para su análisis y manejo fue el MJ Opticom Monitor, versión 3.1.

Las condiciones de la PCR en tiempo real fueron; 95°C por 1min, 45 ciclos [95°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto, 72 °C por 30 segundos], con una lectura de la fluorescencia después de cada ciclo; una curva de desnaturalización 60°C a 90°C con lectura de fluorescencia cada 0.2 °C; y una incubación final de las muestras a 10 °C por tiempo indefinido.

5.6 Cálculos y análisis estadístico

El número de moléculas de los RNAm cuantificados, se calcularon a partir de una curva de calibración con una concentración conocida, del gen Ribosomal 18S (Rib 18S). El análisis, se realizó con el programa estadístico Statistix 9.0, mediante la aplicación de un análisis de varianza de una vía (ANOVA).

Cuadro 3. Oligonucleótidos para PCRtr

Gen	Oligonucleótido sentido	Tamaño Fragmento	TM	[Mgcl₂]
Transportador catiónico de aminoácidos (CAT 1) AY371320	GTCGGTTGCAAAGACCATTT	329 pb	56°C	1.0 μM
	Oligonucleótido Antisentido GAGCGGTGCTGACAACAGTA			
Transportador catiónico de aminoácidos (b0,+AT) EF127857	Oligonucleótido Sentido CGGAGAGAGGAUGAGAAGU	562 pb	56°C	1.0 μM
	Oligonucleótido Antisentido GCCCCGCTGATGATGATGATGA			
Miosina de cadena pesada 4 (MyH4) NM_001123141	Oligonucleótido Sentido AGAUUUCUGACCUGACUG	340 pb	56°C	1.5 μM
	Oligonucleótido Antisentido TCTCCCTCCATCTTCTTC			
Ribosomal 18s cerdo (RIB 18s) AY265350	Oligonucleótido Sentido GGCCTCACTAAACCATCCAA	295 pb	56°C	1.5 μM
	Oligonucleótido Antisentido TAGAGGGACAAGTGGCGTTC			

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Comportamiento Productivo.

En el cuadro 4, se muestran los valores obtenidos en las variables; ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA) debido a la adición de leucina, isoleucina o ambas, a la dieta. No se observó efecto de la adición de leucina en la GDP ($P = 0.103$), CDA ($P = 0.786$) ni CA ($P = 0.291$). Isoleucina tendió a reducir la GDP ($P = 0.071$) y el CDA ($P = 0.059$), pero no afectó la CA ($P = 0.337$). No se observó efecto de la interacción leucina x isoleucina ($P > 0.134$). Por otra parte, cuando se analizó el efecto de la adición individual o en forma conjunta de estos aminoácidos a la dieta base, se observó una disminución en la GDP debido a leucina ($P = 0.033$), isoleucina ($P = 0.025$) y ambas ($P = 0.020$). El CDA y la CA no se afectaron por la adición individual o conjunta de leucina e isoleucina ($P > 0.10$).

Resultados similares fueron reportados por Gatnau *et al.*, (1995) y Shriver *et al.*, (2003) quienes observaron que la incorporación de leucina o isoleucina a la dieta base trigo, no presentó efectos significativos en el comportamiento productivo de cerdos en crecimiento. Por otra parte Lordelo *et al.* (2008) y Barea *et al.*, (2009) encontraron que la incorporación de isoleucina a la dieta presenta un efecto similar en el comportamiento productivo de cerdos con respecto a la dieta base. Sin embargo aun cuando estos estudios han indicado que la adición de estos aminoácidos tienen poco o nulo efecto en los parámetros productivos, es importante mencionar el beneficio que se produce al reducir la excreción de N en

forma de urea en orina o heces (Shriver *et al.*, 2003) mediante la reducción en el nivel de PC acompañada de la adición de aminoácidos libres.

Cuadro 4. Efecto de la adición de leucina (Leu) e isoleucina (Ile) y la adición de leucina-isoleucina a la dieta a base de trigo, en la ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA) de cerdos en crecimiento.

Variable	Tratamientos				Contrastes ortogonales			
	Base	B+Leu	B+Ile	+Leu+Ile	EE	Leu	Ile	+Le+Ile
GDP ^{a,b,c} Kg/día	0.541	0.452	0.447	0.443	0.027	0.103	0.071	0.134
CDA Kg/día	0.910	0.970	0.738	0.733	0.099	0.786	0.059	0.749
CA	1.665	2.132	1.692	1.687	0.211	0.291	0.337	0.281

^a Base vs. +Leu: P<0.033

^b Base vs. +Ile: P<0.025

^c Base vs. +Leu+Ile: P<0.020

6.2 Parámetros de la calidad de la canal

6.2.1 Medición de grasa dorsal (GD) y área del ojo de la costilla (AOC)

En el Cuadro 5, se muestran los resultados de espesor de la grasa dorsal (GD) y área del ojo de la costilla de los animales sacrificados en este trabajo. El espesor de GD no se afectó por la adición de leucina (P = 0.289) o isoleucina (P = 0.475); la interacción leucina x isoleucina tampoco fue significativa (P = 0.174). El AOC no se afectó por la adición de leucina (P = 0.719) o isoleucina (P = 0.280); la interacción leucina x isoleucina no fue significativa (P = 0.267).

Diversos autores mencionan que las dietas bajas en proteína tienden a incrementar la grasa dorsal en las canales de cerdo, por lo que la adición de aminoácidos sintéticos como isoleucina y leucina, podrían contribuir a reducir su espesor de grasa dorsal. No obstante los resultados del presente trabajo muestran que la adición de leucina, isoleucina o ambos aminoácidos no afectan el espesor de la GD ni el AOC de las canales de cerdo.

Cuadro 5. Efecto de la adición de leucina (Leu) e isoleucina (Ile) y la adición de ambos a la dieta a base de trigo, en el Área del Ojo de la Costilla (AOC) y Grasa Dorsal (GD) de cerdos en crecimiento.

Variable	Tratamientos				EE	Contrastes ortogonales		
	Base	B+Leu	B+Ile	+Leu+Ile		Leu	Ile	+Le+Ile
GD cm	0.635	0.605	0.445	0.667	0.079	0.289	0.475	0.174
AOC cm ²	12.338	11.413	9.678	11.450	1.555	0.719	0.280	0.267

Los resultados del presente trabajo son similares a los observados por Figueroa *et al.* (2004, 2002) quienes encontraron que, al reducir el contenido de proteína de la dieta y adicionar aminoácidos libres como isoleucina, no se afectaba la acumulación de grasa dorsal en los cerdos en crecimiento. Por otra parte ciertos autores mencionan que dietas bajas en proteína y adicionadas con aminoácidos libres no afectan el área del ojo de la costilla y la grasa dorsal (Kerr *et al.*, 2003). Similares efectos se observaron en cerdos en finalización alimentados con dietas bajas de proteína adicionadas con aminoácidos cristalinos, en donde no se afectó

el espesor de la grasa dorsal ni la respuesta productiva de los animales (Figuroa *et al.*, 2008).

6.3 EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE AMINOACIDOS

6.3.1 Expresión del gen *b0,+ AT* y *CAT 1* yeyuno

El sistema de transporte dependiente del Na⁺, *b0,+AT*, es considerado como uno de los principales transportadores de AA catiónicos y neutros de la membrana celular, y es especialmente importante para la absorción de AA en enterocitos (Mann *et al.*, 2003). Adicionalmente, en trabajos realizados por Munck y Munck (1997), se encontró que *b0,+AT* es un potente sistema de transporte que intercambia lisina intracelular por leucina extracelular en la membrana luminal del intestino delgado en ratas y conejos, hecho que demuestra la importancia del balance de aminoácidos en ambos lados de la membrana celular para regular la expresión y actividad de éste y otros transportadores.

En el presente estudio se encontró que la adición de leucina, de forma individual (T3; P=0.009) y en combinación con isoleucina (T4; P=0.040), redujo la expresión de *b0,+AT* en yeyuno, en comparación con la dieta base. Pero la adición sola de isoleucina no produjo ningún cambio con respecto a la dieta base (P=0.111; Cuadro 6).

La expresión de *b0,+AT* en yeyuno se redujo en 88, 67 y 79% en los animales que consumieron las dietas adicionadas con leucina, isoleucina o ambas, respectivamente, con respecto a la dieta base. Algunos autores mencionan que la

expresión de b0,+AT puede afectarse debido a la concentración y calidad de la proteína en la dieta o al estado fisiológico de los individuos (Nagawa *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2009). Además, Gilbert *et al.* (2008) mencionan que el empleo de dietas en aves con el mismo nivel de proteína pero con dosis altas de isoleucina y leucina tienden a disminuir la expresión de b0,+AT. Lo anterior fue similar a lo observado en el presente estudio donde la reducción en la expresión de b0,+AT ocurrió por el incremento en el contenido de leucina en la dieta (cuadro 6). Además, es importante tomar en cuenta que los niveles de expresión de b0,+AT también pudieron variar dependiendo de la sección del intestino delgado, ya que en pruebas preliminares al inicio del estudio se buscó identificar la expresión del mensajero en duodeno e íleon, sin lograr la amplificación clara del mismo en esas secciones.

Cuadro 6. Expresión relativa de CAT1 y b0,+ AT por efecto de la adición de leucina (Leu) e isoleucina (Ile) en yeyuno de cerdos en crecimiento [(moléculas de ARNm del transportador / número de moléculas de ARN ribosomal 18S) X1000].

Gen	Tratamientos				Contrastes ortogonales			
	Base*	B*+Leu	B*+Ile	*+Leu+Ile	EE	Leu	Ile	+Le+Ile
b0,+AT ^{a,b}	1.692	0.207	0.551	0.357	0.301	0.009	0.111	0.041
CAT1 ^{a,b}	0.720	4.177	1.872	2.282	0.308	0.001	0.238	0.001

^a Efecto por la adición de leucina (P<0.001)

^b Efecto por adición de leucina e isoleucina (P<0.05)

Finalmente, se ha visto que la genética de los individuos también afecta el patrón y nivel de expresión de estos transportadores. Por ejemplo, Gilbert *et al.* (2008) encontraron que la expresión de los transportadores de AA varía según la línea de

pollos empleada; y Wang *et al.* (2009) hallaron que en cerdos tibetanos se expresa con mayor abundancia el gen b0,+AT en duodeno y en menor proporción en yeyuno, efecto contrario al hallado en este experimento.

La expresión del transportador CAT1 en yeyuno se afectó de manera diferenciada; la adición de leucina la incrementó ($P < 0.001$) mientras que isoleucina la redujo ($P = 0.238$; Cuadro 6). Pero, debido a que la interacción leucina x isoleucina fue significativa ($P = 0.001$), se analizó el efecto de adicionar de manera individual o combinada estos AA a la dieta base. Así, leucina sola ($P = 0.001$) o en combinación con isoleucina ($P < 0.050$) incrementó la expresión de CAT1. La adición de isoleucina sola no afectó ($P > 0.100$) la expresión de CAT1.

En trabajos recientes en mamíferos no rumiantes se menciona que los niveles de expresión de CAT1 son diferentes dependiendo de la sección de intestino (duodeno, yeyuno e íleon) que se estudie (Liao *et al.*, 2008); e incluso se ha visto que su expresión también varía dependiendo del tejido y del estado fisiológico del animal (Liao *et al.*, 2008; Alemán *et al.*, 2009). En el presente trabajo no fue posible detectar la expresión de este transportador en duodeno e íleon, posiblemente porque la expresión de CAT1 en cerdos ocurre principalmente en yeyuno. Tomando esto último en consideración, es probable que las diferencias entre especies sean importantes. Por ejemplo, Woodward *et al.* (2010) mencionaron que en equinos, tanto el intestino delgado como el intestino grueso contribuyen de manera importante en la absorción de aminoácidos catiónicos vía los transportadores CAT1. Estos autores, encontraron una mayor concentración

de CAT1 en yeyuno e íleon, y menor concentración en colon; concluyendo que en esa especie ambas porciones del intestino contribuyen de manera importante con la absorción de aminoácidos catiónicos.

Los resultados del presente y otros trabajos indican que la expresión de CAT1 puede variar dependiendo de la concentración de aminoácidos en el medio. Por ejemplo, en un modelo de células placentarias de humanos, se observó que la presencia de aminoácidos neutros como leucina en combinación con sodio (Na⁺) inhibe la expresión de CAT1, aunque este efecto también depende del organismo y del tejido estudiado (Kamath *et al.*, 1999). Además, es probable que el incremento en la concentración de leucina en el medio extracelular inhiba la absorción de lisina, primer aminoácido limitante en las dietas basadas en cereales en cerdos en crecimiento. Esto explicaría parcialmente la baja ganancia de peso de los animales que consumieron las dietas adicionadas con leucina.

6.3.2 Expresión de transportadores de aminoácidos (b⁰,+AT, CAT1) en tejidos de hígado, músculo largo dorsal y músculo semitendinoso.

Originalmente, en el presente trabajo se buscó detectar la expresión de b⁰,+AT y CAT1 en músculo largo dorsal y semitendinoso, sin embargo ésta fue escasa o nula. Esto tiene sentido si se considera que los sistemas de transporte son restringidos a tejidos específicos en base a sus funciones características, regulación y fisiología del mismo tejido (Moret *et al.*, 2007). CAT y b⁰,+AT forman parte de un grupo de sistemas para el transporte de aminoácidos catiónicos y

neutros localizados principalmente en el intestino delgado y en células hepáticas (Bode, 2001). Aunque existen reportes que muestran en músculo la expresión de los transportadores CAT1, CAT2, y CAT2a, se desconoce exactamente su afinidad por cada uno de los aminoácidos catiónicos. Sin embargo, se especula que el transportador de baja afinidad CAT2a favorece una mayor absorción de lisina y arginina (Zorzano *et al.*, 2000). Además, es probable que la concentración de aminoácidos en la dieta y en consecuencia su abundancia en plasma afecte la expresión de cada uno de los transportadores de aminoácidos específicos a nivel de tejidos. En un trabajo anterior a éste, Barrera (2009) probó diferentes niveles de lisina en la dieta de cerdos en crecimiento y observó una mayor expresión de los transportadores CAT en tejido muscular.

6.3.3 Expresión de miosina en músculo largo dorsal (MLD) y músculo semitendinoso (MST)

Los resultados de expresión de miosina en tejido muscular se presentan en el Cuadro 7. La expresión relativa de miosina en músculo largo dorsal (MLD) no se afectó por la adición de leucina ($P = 0.803$) ni por la interacción leucina x isoleucina ($P=0.923$); pero, isoleucina la incrementó ($P = 0.001$). En contraste, la expresión relativa de miosina en musculo semitendinoso (MST) se redujo ($P < 0.001$) por la adición de isoleucina a la dieta base. Similar a lo ocurrido en MLD, no se observó efecto de leucina ($P = 0.214$) o la interacción leucina x isoleucina ($P = 0.826$). Por otra parte, cuando se comparó el efecto de la adición individual o

combinada de estos AA a la dieta base, con leucina se incrementó ($P < 0.001$) la expresión de miosina en MST, pero cuando se adicionó en combinación con isoleucina la redujo ($P < 0.001$).

Cuadro 7. Expresión relativa de miosina por efecto de la adición de leucina (Leu) e isoleucina (Ile) en músculo largo dorsal (MLD) y músculo semitendinoso (MST) de cerdos en crecimiento [(moléculas de ARNm miosina / moléculas de ARN ribosomal 18S) X1000].

Gen	Tratamientos				EE	Contrastes ortogonales		
	Base	B+Leu	Base+Ile	+Leu+Ile		Leu	Ile	+Leu+Ile
MLD ^{a, b}	1.801	1.285	6.886	6.657	1.47	0.803	0.001	0.923
MST ^{c, d}	15.96	17.27	2.18	4.04	1.24	0.214	0.000	0.826

^a Efecto por adición de isoleucina ($P < 0.050$)

^b Efecto por la adición de leucina-isoleucina ($P < 0.050$)

^c Efecto por adición de isoleucina ($P < 0.001$)

^d Efecto por adición de leucina ($P < 0.001$)

La actividad de contracción en las células musculares ocurre gracias a la interacción de las proteínas contráctiles actina y miosina. Miosina es la proteína muscular más abundante. Hasta el momento se han descubierto diferentes isoformas de los genes de miosina, lo que permite clasificar a las fibras en: a) fibras de contracción lenta, que corresponden a genes de miosina de cadena pesada tipo I; b) fibras de contracción rápida, que corresponden a genes de miosina tipo II (Lefaucheur et al., 2002). De acuerdo con Reiser et al. (1988), la expresión diferenciada de cada una de las isoformas de miosina tiene efecto en las características fisiológicas y propiedades contráctiles del músculo de que se trate. El ARNm de miosina estudiado en el presente trabajo corresponde a la

cadena de miosina pesada 4, cuya proteína también es conocida como miosina tipo IIB.

Los resultados del presente trabajo coinciden con lo encontrado por Hemmings *et al.* (2009), quienes aunque con un nivel bajo, observaron la expresión de la isoforma IIb de miosina en músculo semitendinoso de ovino, pero no detectaron su expresión en MLD. En contraste, Gunawan *et al.* (2007) evaluaron la expresión de miosina en diferentes músculos de cerdos y encontraron que ésta varía dependiendo del tipo de fibra muscular evaluada, en ese trabajo la expresión y concentración de la isoforma IIb de miosina fue superior en el músculo longissimus en comparación con el semitendinoso rojo.

Hasta el momento no se encontraron reportes que indiquen si el tipo de dieta de los cerdos o la concentración y relación de aminoácidos en la misma afecta la expresión de una o más isoformas en particular. En este trabajo se observó que la adición de isoleucina sí afecta la expresión de la isoforma IIb de miosina de cadena pesada, y que este efecto es de forma diferenciada ya que incrementa la expresión en MLD pero la inhibe en MST. Sin embargo algunos trabajos en humanos (Verhoeven *et al.*, 2009) demostraron que la suplementación con leucina no afecta la masa muscular en hombres adultos. Por el contrario, los trabajos de Rieu *et al.* (2006 y 2007) han demostrado que una dieta con proteína rica en leucina o la suplementación con ese aminoácido favorecen la síntesis de proteínas musculares en hombres de edad avanzada. Esto, posiblemente debido a que leucina inhibe la degradación de proteínas musculares y estimula la síntesis de proteína muscular postprandial (Louard *et al.*, 1995; Norton *et al.*, 2006).

6.3.4 Expresión de Factor de crecimiento similar a insulina (IGF) en tejidos de hígado, musculo largo dorsal y musculo semitendinoso.

El factor de crecimiento similar a insulina-I (IGF-1) desempeña un papel importante como regulador de diversas funciones anabólicas/somatogénicas de la hormona de crecimiento (Mejía N. *et al.*, 2002). Entre otros, el estado nutricional del individuo es un factor clave que puede regular la actividad y función del eje GH-IGF. En el presente estudio no fue posible detectar la expresión de IGF en células hepáticas y musculares, probablemente debido a que la dieta base baja en proteína, adicionada con leucina e isoleucina no permitió la expresión suficiente de IGF-1 para que ésta pudiera ser detectada o bien por la ausencia de la misma. Similares resultados se han reportado en cerdos y ratas que al ser sometidos una dieta baja en proteína presentan baja o nula expresión y secreción de IGF-1 (Sohlström *et al.*, 1998; Katsumata *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

La adición de leucina e isoleucina a la dieta base trigo, enriquecida con lisina, treonina y metionina, afectó negativamente la ganancia diaria de peso de cerdos en crecimiento, sin afectar las características de la canal. Con respecto a la expresión de transportadores de AA en yeyuno, la adición isoleucina sola no afectó la expresión de ninguno de los transportadores. En contraste cuando se adiciona isoleucina junto con leucina, o por la adición de leucina sola, se reduce la expresión de b⁰,+AT y se incrementa la de CAT1. La expresión de miosina se incrementa en el músculo largo dorsal, pero se reduce en el semitendinoso en respuesta a la adición de isoleucina. En este estudio, no se detectó expresión de IGF-1 en hígado ni tejido muscular.

LITERATURA CITADA

- Aleman G., López A., Ordaz G., Torres N., Tovar AR.,2009.Changes in messenger RNA abundance of amino acid transporters in rat mammary gland during pregnancy, lactation, and weaning. *Metabolism*. 58(5):594-601.
- 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.
- AMSA. 2001. *Meat Evaluation Handbook*. American Meat Science Association.
- 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.
- Apple J. K., Maxwell C.V., Brown D.C., Friesen K.G., Musser R.E., Johnson Z.B. and T. Armstrong A. 2004. Effects of dietary lysine and energy density on performance and carcass characteristics of finishing pigs fed ractopamine. *J. Animal Sci.* 82(11):3277-3287.
- Bannai,S. 1984. Induction of cystine and glutamate transport activity in human fibroblasts by diethyl maleate and other electrophilic agents. *J. Biol. Chem.* 259:2435- 2440.

Barea R., Dubois S., Gilber, H., Sellier P., van Milgen J. and Noblet J..
2010. Energy utilization in pigs selected for high and low residual feed intake.
J. Anim Sci. 288:2062-2072.

Barrera, M.A., M. Cervantes, W.C. Sauer, A. Araiza, N. Torrentera, and M.
Cervantes. 2004. Ileal amino acid digestibility and performance of growing
pigs fed wheat-based diets supplemented with xylanase. J. Anim. Sci.
82:1997-2003.

Barton P. J. R., Alonso S, Cohen A., Daubas P., Garner I, Pinset C., Robert B,
Weydert A. and Buckingham M. 1987. Actin and myosin gene expression in
mouse striated muscle. J. Anim. Sci. 65: 157 - 167

Bauch C., Forster N., Loffing-Cueni D., Summa V. & Verrey F., 2003. Functional
cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in
MDCK cells. J Biol Chem. 278: 1316–1322

Bikker, P., Verstegen M.W.A., and Bosch M., 1994. Amino acid composition of
growing pigs in affected by protein and energy intake. J. Nutr. 124(10):1961-
1969.

Bode BP. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport 2001. *J
Nutr.*;131:2475S–2485S

Bohe´ J, Low A, Wolfe RR, Rennie MJ. 2003. Human muscle protein synthesis is
modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose
response study. J Physiol.;552:315–24

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.

- Broer, S. 2006. The SLC6 orphans are forming a family of amino acid transporters. *Neurochemistry International*. 48: 559-567.
- Broer, S. and Wagner, C.A. 2002. Structure-function relationships of heterodimeric amino acid transporters. *Cell Biochem, Biophys*, 36 : 155-68
- Broer, A., B.Friedrich, Wagner C.A, Fillon S., Ganapathy V, Lang F., and Broer S., 2001. Association of 4F2hc with light chains LAT1, LAT2 or y+LAT2 requires different domains. *Biochem. J.* 355:725-731.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9.
- Christensen HN. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 70: 43–77, 1990
- Closs EI (2002) Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11:99–107
- Closs EI, Simon A, Vekony N, Rotmann A. 2004. Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr* 134: 2752S–2767S.
- Cook SJ, Morley SJ .2007. Nutrient-responsive mTOR signalling grows on *Sterile* ground. *Biochemical Journal* 403 e1-e3

- Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. 2005. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr.* 135:376–82.
- Crozier, S. J., S. R. Kimball, S. W. Emmert, J. C. Anthony, L. S. Jefferson. 2005. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J. Nutr.* 135: 376-82.
- Deldicque, L. Sanchez Canedo, C. Horman, S. De Potter, I. Bertrand, L. Hue L. and Francaux M. 2008. Antagonistic effects of leucine and glutamine on the mTOR pathway in myogenic C₂C₁₂ cells. *Amino Acids* Volume 35, Number 1, 147-155
- 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
- Escobar J., Frank, J.W., Suryawan A., Nguyen H.V., Kimball S.R., Jefferson L.S., Davis T.A. 2005. Physiological rise in plasma leucine stimulates muscle protein synthesis in neonatal pigs by enhancing translation initiation factor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E914-E921.
- Feng, D., X. Zhou, J. Zuo, C. Zhang, Y. Yin, X. Wang, and T.Wang. 2008. Segmental distribution and expression of two heterodimeric amino acid transporter mRNAs in the intestine of pigs during different ages. *J. Sci. Food Agric.* 88:1012–1018.
- Figuroa, J. L., A. J. Lewis, P. S. Miller, R. L. Fischer, R. S. Gómez, and R. M. Diedrichsen. 2002. Nitrogen metabolism and growth performance of gilts fed

standard corn-soybean meal diets or low-crude protein, amino acid-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 80:2911–2919

Figueroa-Velasco José L., Cervantes-Ramírez Miguel, Cuca-García Juan M., Méndez-López. Mihail 2004. Respuesta de cerdos en crecimiento y finalización a dietas con baja proteína y energía. *Agrociencia*, vol. 38, número 004

Fox HL, Pham PT, Kimball SR, Jefferson LS, and Lynch CJ. 1998. Amino acid effects on translational repressor 4E-BP1 are mediated primarily by L-leucine in isolated adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 275: C1232–C1238.

García, H., K. Minero, M. Cervantes, A. Morales, V. Méndez, A.B. Araiza, Barrera M., P. Carrillo y D. Pérez. 2009. Nivel de proteína y adición de aminoácidos a dietas base trigo para cerdos en crecimiento.

Gatnau, R., C. Cain, M. Drew, and D. Zimmerman. 1995. Mode of action of spray-dried porcine plasma in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 73(Suppl. 1):82.

Gautsch TA, Anthony JC, Kimball SR, Paul GL, Layman DK, Jefferson LS. -1994. Availability of eIF4E regulates skeletal muscle protein synthesis during recovery from exercise. *Am J Physiol.* 274: C406–C414

Gerrard D. E, Okamura C. S, Ranalletta M. A. and Grant A. L. Developmental expression and location of IGF-I and IGF-II mRNA and protein in skeletal muscle *J Anim Sci* 1998. 76:1004-1011.

- Gilbert, E. R., H. Li, D. A. Emmerson, K. E. Webb, Jr., and E. A. Wong. 2008. Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. *J. Nutr.* 138: 262-271.
- González C.. 1994. Utilización de la batata (*Ipomoea batata L*) en la alimentación de cerdos confinados y en pastoreo. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía. UCV. Venezuela . 234 p.
- 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. Physio. Endocrinol. Metab.* 281: E466-71.
- Gunawan A. M., Park S. K., Pleitner J. M., Feliciano L., Grant A. L. and Gerrard D. E.: 2007. Contractile protein content reflects myosin heavy-chain isoform gene expression. *J. Anim Sci.* 2007. 85:1247-1256.
- Hemmings K. M., Parr T., Daniel Z. C. T. R., Picard B., Buttery P. J. and Brameld J. M. 2009. Examination of myosin heavy chain isoform expression in ovine skeletal muscles. *J. Anim Sci.* 87:3915-3922
- Hinault Marie-Pierre, Ben-Zvi Anat, Goloubinoff Pierre. (2006) Chaperones and proteases. *Journal of Molecular Neuroscience* Volume 30:3:249-265.
- INRA. 1985. Alimentación de los animales monogástricos (cerdo, conejo, aves). Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 283 p.

John N. Phelan, William J. Gonyea, 1997, Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle, *Volumen* 247:179-188

Katsumata M, Kawakami S, Kaji Y, Takada R & Dauncey MJ .2002. Differential regulation of porcine hepatic IGF-I mRNA expression and plasma IGF-I concentration by a low lysine diet. *Journal of Nutrition* 132:688–692

Kerr B. J., Southern L. L., Bidner T. D., Friesen K. G., and Easter R. A.. 2003. Influence of dietary protein level, amino acid supplementation, and dietary energy levels on growing-finishing pig performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 81:3075–3087

Kimball S. R., Shantz L. M., Horetsky R. L., Jefferson L. S. 1999. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J. Biol. Chem.* 274:11647-11652

Kimball SR.2002. Regulation of global and specific mRNA translation by amino acids. *J Nutr* 132: 883–886

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.

Koohmaraie M., Matthew P. Kent, Steven D., Shackelford, Veiseth Eva, Tommy L. Wheeler .2002. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship?. *Meat Science* 62:345–352

- Laplante Mathieu, and Sabatini David M., 2009. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 122(20): 3589–3594.
- Lawrence, T. L. J., and V. R. Fowler. 1997. *Growth of Farm Animals*. CAB Int., Wallingford, Oxon, UK. 344 pp.
- Lefaucheur Louis, Ecolan Patrick, Plantard Lydia, Gueguen Naïg, 2002, New Insights into Muscle Fiber Types in the Pig *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 50, 719-730
- Lefaucheur, L. 1989. Les differents types de fibres musculaires chez le porc. *INRA. Prod. Anim.* 3: 205-213
- Liao SF, Vanzant ES, Boling JA, Matthews JC. 2008. Identification and expression pattern of cationic amino acid transporter-1 mRNA in small intestinal epithelia of Angus steers at four production stages. *J Anim Sci.* Mar;86(3):620-31.
- Liao, S. F., E. S. Vanzant, D. L. Harmon, K. R. McLeod, J. A. Boling, and J. C. Matthews. 2009. Ruminant and abomasal starch hydrolysate infusions selectively decrease the expression of cationic amino acid transporter mRNA by small intestinal epithelia of forage-fed beef steer. *J. Dairy Sci.* 92:1124–1135.
- 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.

Mann Giovanni E. Yudilevich David L., and Sobrevia Luis. 2003. Regulation of Amino Acid and Glucose Transporters in Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Physiol. Rev.* 83: 183-252, 2003

Mayer C., and Grummt I.. 2006. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 25:6384-6391.

Mejía-Naranjo, W., M. Sánchez-Gómez, D. LeRoith. 2002. The growth hormone – Insulin-like growth factor-I axis and immunity. In: *Growth and Lactogenic Hormones. Neuroimmune Biology*, Vol 2. Ed. L. Matera & R. Rapaport. Elsevier, Amsterdam. p. 9-25.

Metayer, J.P., Grosjean F., y Cataing J.. 1993. Study of variability in French cereals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 43:87-108.

Moral Barrera L. E, Ramírez Gómez B.P, Muñoz Jumilla A.R., 2003. Crecimiento regional de la producción de carne de cerdo en México, 1980-2005. *Análisis Económico*. Núm 52, vol XXIII. Primer cuatrimestre de 2008.

Moret, C., M.H. Dave, N. Schulz, J.X. Jiang, F. Verrey, and C.A. Wagner. 2007. Regulation of renal amino acid transporters during metabolic acidosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292:F555–F566.

Munck BG, Munck LK. Na⁺-independent transport of bipolar and cationic amino acids across the luminal membrane of the small intestine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 272: R1060–R1068, 1997

Nava Navarrete Juan de Jesús, Trueta Santiago Rafael, Finck Vite Bernardo, Barranco Villagrana Bárbara, Osorio Herrera Edith, Lecumberri López Jorge 2009. Impactos del nivel tecnológico en la eficiencia productiva y variables económicas, en granjas porcinas de Guanajuato, Jalisco, Sonora y Yucatán. *Técnica Pecuaria Méx* 2009;47(2):157-172.

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.

Olson, E. N. 1990. MyoD family: A paradigm for development? . *Genes Dev.* 4: 1454-1461

Pérez-Guisado, J. 2009. Rendimiento deportivo: composición corporal, peso, energía macronutrientes y digestión (II). *Rev Int Med Cienc Act Fís Deporte*; 26(134)

Reiser P.J., Kasper C.E., Greaser M.L. & Moss R.L. (1988) Functional significance of myosin transitions in single fibers of developing soleus muscle. *American Journal of Physiology* 254 (Cell Physiology 23), C605-613.

Rieu I, Balage M, Sornet C, Debras E, Ripes S, Rochon-Bonhomme C, Pouyet C, Grizard J, Dardevet D. 2007. Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition*. 23(4):323-31.

Rieu I, Balage M, Sornet C, Giraudet C, Pujos E, Grizard J, Mosoni L, Dardevet D. 2006. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol*. 15;575 (Pt 1):305-15.

Rivero JLL, Serrano AL, Henckel P, Agüera E. 1993. Muscle fiber type composition and fiber size in successfully and unsuccessfully endurance-raced horses. *J Appl Physiol* 75: 1758–1766.

Russell, L. E., B. J. Kerr, and R. A. Easter. 1987. Limiting amino acids in an 11% crude protein corn-soybean meal diet for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 65:1266–1272.

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.

Segawa Hiroko, Miyamoto Ken-ichi, Ogura Yoshio., Haga Hiromi, Morita Kyoko, Katai Kanako, Tatsumi Sawako, Nii Tomoko, Taketani Yutaka and Takeda Eiji. 1997. Cloning, functional expression and dietary regulation of the mouse neutral and basic amino acid transporter (NBAT). *Biochem. J.* 328, 657±664

Shriver, J. A., S. D. Carter, A. L. Sutton, B. T. Richert, B. W. Senne, and L. A. Pettey. 2003. Effects of adding fiber sources to reduced-crude protein, amino

acid-supplemented diets on nitrogen excretion, growth performance, and carcass traits of finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 81:492–502

Shriver, J. A., S. D. Carter, L. A. Pettey, and B. W. Senne. 2000. Effects of adding fiber sources to low protein, amino acid-supplemented diets on nitrogen excretion and performance of finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 78:168.

Sohlström, A., Katsman, A., Kind, K. L., Grant, P. A., Owens, P. C., Robinson, J. S. & Owens, J. A. 1998. Effects of acute and chronic food restriction on the insulin-like growth factor axis in the guinea pig. *J. Endocrinol.* 157:107-114

Sonenberg N .1994. Regulation of translation and cell growth by eIF-4E. *Biochimie.* 76:839–84

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).

Terán, G.; Sarmiento, L.; Segura, J.; Torres, F. y Santos, R. 2004. Comportamiento productivo, características de la canal y peso del tracto gastrointestinal de cerdo alimentados con aceite de palma africana (*Elaeis guineensis*). *Téc. Pecu. Méx.* 42(2): 181-192.

Verhoeven S, Vanschoonbeek K, Verdijk LB, Koopman R, Wodzig WK, Dendale P, van Loon LJ. 2009. Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. *Am J Clin Nutr*:1468-75

Wang Wence, Gu Wanting, Tang Xiangfang, Geng Meimei, Fan M., Li Tiejun, Wuying Chu, Changyou Shi, Ruilin Huang, Hongfu Zhang and Yulong Yin. 2009. Molecular cloning, tissue distribution and ontogenetic expression of the amino acid transporter b^{0,+} cDNA in the small intestine of Tibetan suckling piglets. *Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 154, Issue 1.

Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T. K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., Zhuang, Y. and Lassar, A. 1991. The myoD gene family - nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251:761-766.

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

Williams, N. H., T.R. Cline, A.P. Schinckel, and D.J. Jones. 1994. The impact of ractopamine, energy intake, and dietary fat on finisher pig growth performance and carcass merit. *J. Animal Sci.* 72(12):3152–3162.

Woodward A. D., Holcombe S. J., Steibel J. P., Staniar W. B., Colvin C. and Trottier N. L. 2010. Cationic and neutral amino acid transporter transcript abundances are differentially expressed in the equine intestinal tract. *J. Anim Sci.* 2010. 88:1028-1033.

Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M.N. (2006).TOR. signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471–484

- Xia Y, Wen HY, Young ME, Guthrie PH, Taegtmeyer H, Kellems RE. 2003. Mammalian target of rapamycin and protein kinase A signaling mediate the cardiac transcriptional response to glutamine. *J Biol Chem* 278: 13143–13150.
- Yao K., Yin Yu-L., Chu W., Liu Z., Deng D., Li T., Huang R., Zhang J., Tan B., Wang W., Wu. (2008). Dietary Arginine Supplementation Increases mTOR Signaling Activity in Skeletal Muscle of Neonatal Pigs. *J. Nutr.* 138:867-872.
- Young, V. R., El-Khoury, A. E., Melchor, S., Castillo L. 1994. The biochemistry and physiology of protein and amino acid metabolism, with reference to protein nutrition. In *Protein Metabolism During Infancy* (Niels, C. R. R., ed.), Nestle Nutrition Workshop Series. 33:128, Vevey/Raven Press, New York.
- Zorzano A., Fandos C., Palacin M., 2000. Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism. *Biochem J.* 349.

ANEXO

Tabla de estadísticos de comportamiento productivo y calidad de la canal

Variable		Tratamientos					P Anova	Contrastes ortogonales			Contraste contra dieta base		
		Base	Base+Leu	Base+Ile	+Leu+Ile	EE		Leu	Ile	+Le+Ile	Leu	Ile	+Le+Ile
GDP	kg/día	0.541	0.452	0.447	0.443	0.027	0.587	0.103	0.071	0.134	0.033	0.025	0.020
CDA	kg/día	0.910	0.970	0.738	0.733	0.099	0.265	0.786	0.059	0.749	0.676	0.242	0.229
CA		1.665	2.132	1.692	1.687	0.211	0.363	0.291	0.337	0.281	0.138	0.930	0.943
GD	cm	0.635	0.605	0.445	0.667	0.079	0.935	0.289	0.475	0.174	0.793	0.115	0.776
AOC	cm ²	12.338	11.413	9.678	11.450	1.555	0.679	0.719	0.280	0.267	0.680	0.248	0.692

Tabla de estadísticos de Expresión de genes

Gen	Tejido	Tratamientos					P Anova	Contrastes ortogonales			Contraste contra dieta base		
		Base	Base+Leu	Base+Ile	+Leu+Ile	EE		Leu	Ile	+Le+Ile	Leu	Ile	+Le+Ile
b0,+AT	Yey	1.692	0.207	0.551	0.35	0.301	0.006	0.009	0.111	0.041	0.001	0.012	0.004
CAT1	Yey	0.720	4.177	1.872	2.28	0.308	0.000	0.000	0.238	0.000	0.000	0.013	0.001
Miosina	MLD	1.801	1.285	6.886	6.65	1.47	0.014	0.803	0.001	0.923	0.806	0.021	0.027
Miosina	MST	15.96	17.27	2.18	4.04	1.24	0.000	0.214	0.000	0.826	0.464	0.000	0.000