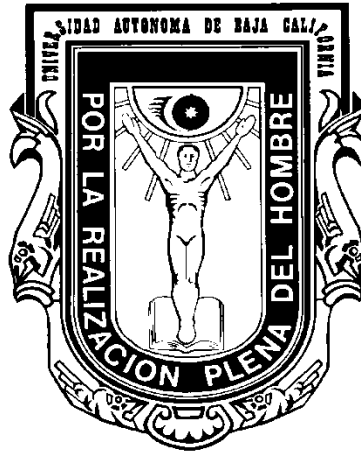


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**



**EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EN INTESTINO  
DELGADO DE CERDOS ALIMENTADOS CON AMINOÁCIDOS LIBRES O LIGADOS  
EN PROTEÍNAS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**PRESENTA:**

**GILBERTO CASTILLO LUNA**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**Dr. MIGUEL CERVANTES RAMÍREZ**

**Dra. ADRIANA MORALES TREJO**

La presente tesis titulada “Expresión de transportadores de aminoácidos en intestino delgado de cerdos alimentados con aminoácidos libres o ligados en proteínas.”, realizada por C. Gilberto Castillo Luna bajo la dirección del Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

**COMITÉ PARTICULAR**

**DIRECTOR** \_\_\_\_\_  
Dr. Miguel Cervantes Ramírez

**CO-CODIRECTORA** \_\_\_\_\_  
Dra. Adriana Morales Trejo

**ASESOR** \_\_\_\_\_  
Dr. Benedicto Alfonso Araiza Piña

POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dra. Adriana Morales Trejo, por su asesoría en el laboratorio, su apoyo y aporte de conocimientos que me han ayudado durante mi formación

Al Dr. Miguel Cervantes Ramírez, por el gran apoyo brindado durante mis estudios de posgrado, además por sus aportaciones y sugerencias en el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Benedicto Alfonso Araiza Piña, por sus enseñanzas al compartir sus conocimientos y ser parte fundamental en el proceso de mi formación.

A todos mis compañeros del Cuerpo Académico de Nutrición Animal (CANA), por el apoyo y buen trabajo en equipo.

## DEDICATORIA

*A dios que me dio la oportunidad tan hermosa de tener esta vida y poder obtener terminar una de mis metas, por cuidarme y protegerme.*

*A mi esposa e hijo por su apoyo incondicional que siempre están conmigo en las buenas y en las malas.*

*A toda mi familia que es parte fundamental en todo este proceso, siendo mi fortaleza y admiración.*

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
ÍNDICE DE CUADROS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA NUTRICIÓN EN CERDOS .....	3
2.2. PROTEÍNA INTACTA EN LA DIETA DE CERDOS.....	4
2.3. AMINOÁCIDOS EN LA NUTRICIÓN DE CERDOS .....	5
2.3.1. AMINOÁCIDOS ESENCIALES Y NO ESENCIALES .....	5
2.4 ABSORCIÓN INTESTINAL.....	6
2.5. MECANISMO Y TRASPORTE DE AMINOÁCIDOS.....	8
2.5.1. SISTEMA B <sup>0+</sup> AT/RBAT .....	9
2.5.2. SISTEMA Y+LAT-1/4F2HC .....	11
2.5.3. SISTEMA B <sup>0</sup> AT-1 .....	12
3. HIPÓTESIS .....	14
4. OBJETIVO.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
4.1 ANIMALES.....	15
4.2 DIETAS .....	15
5.3 SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS.....	17
5.4 ANÁLISIS DE LABORATORIO .....	17
5.4.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y RETROTRANSCRIPCIÓN .....	17
5.4.2 REACCIÓN DE LA CADENA DE POLIMERASA PUNTO FINAL .....	18

5.4.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR) .....	20
5.4.4 ANÁLISIS QUÍMICOS .....	20
5.4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	21
6. RESULTADOS .....	22
6.1 EXPRESIÓN DE ARN .....	22
6.2 CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA.....	22
7. DISCUSIÓN.....	25
7.1 EXPRESIÓN DE $b^{0,+}$ .....	25
7.2 EXPRESIÓN DE $y^+L$ .....	27
7.3 EXPRESIÓN DE $B^0$ .....	27
7.4 CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA .....	28
8. CONCLUSIÓN.....	29
9. LITERATURA CITADA.....	30

## ÍNDICE DE CUADROS

**Cuadro 1.** Sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos

**Cuadro 2.** Composición de las dietas experimentales

**Cuadro 3.** Oligonucleótidos específicos empleados para las reacciones de PCR y PCR cuantitativo

**Cuadro 4.** Programa utilizado para la técnica de PCR punto final

**Cuadro 5.** Expresión de los transportadores de AA  $b^{0,+}$ ,  $y^{+L}$ ,  $B^0$ , en intestino delgado de cerdos alimentados con dietas conteniendo aminoácidos libres (AAL) o totalmente en proteína intactas (AAP)

**Cuadro 6.** Concentración de aminoácidos libres en suero de cerdos alimentados con dietas formuladas parcialmente con aminoácidos libres (AAL) o ligados a proteína.(AAP)

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Modelo hipotético de mamífero asociado a proteínas transportadoras de AA cationicos en células epiteliales de intestino delgado.

## RESUMEN

Debido a que los aminoácidos (AA) en proteínas intactas de la dieta están disponibles para absorción en intestino delgado varios minutos después que AA libres, se especula que la abundancia de sus transportadores es diferente que cuando se incorporan en forma libre. Este experimento se realizó para evaluar el efecto de la forma (libre vs. Proteína intacta) en que se incorporan los AA en la dieta en la expresión de los transportadores de AA  $b^{0,+}$ ,  $y^+L$  (AA catiónicos) y  $B^0$  (AA neutros), se analizaron las diferencias de expresión en los segmentos intestinales (duodeno, yeyuno e íleon) de cerdos en crecimiento. Se utilizaron 8 cerdos de raza Landrace x Duroc x Yorkshire ( $25 \pm 1.5$  kg), distribuidos en dos tratamientos de acuerdo a su sexo, peso, edad y camada: T1, dieta base trigo adicionado con los aminoácidos libres His, Ile, Trp, Leu, Lys, Met, Phe, Thr y Val (AAL); y T2, dieta trigo-pasta de soya (los aminoácidos están incluidos en la proteína de la soya, AAP). Ambas dietas se formularon para cubrir el 100% de los requerimientos del NRC para cerdos en crecimiento. El experimento tuvo una duración de 21 días. Los resultados de expresión en cada uno de los segmentos de mucosa intestinal fueron: en duodeno, la expresión del transportador  $b^{0,+}$  fue mayor en cerdos con proteína intacta ( $P=0.036$ ) comparado con la dieta de AA libres; en íleon la expresión del transportador  $y^+L$  tendió a ser superior en cerdos con AA libres ( $P=0.98$ ). La expresión de los transportadores fue mayor en yeyuno que en los otros segmentos intestinales. En conclusión la forma en que se adicionan los AA en la dieta afecta su expresión de cada transportador de AA en los diferentes segmentos intestinales.

Palabras clave: aminoácidos,  $b^{0,+}$ ,  $y^+L$  y  $B^0$



## ABSTRACT

Because the amino acid (AA) in intact dietary protein are available for absorption in the small intestine several minutes after AA free, it is speculated that the abundance of its transporters is different than when incorporated in free form. This experiment was conducted to evaluate the effect of the form (free vs. Intact protein) in which AA are incorporated in the diet in expressing transporters AA  $b^{0,+}$ ,  $y^+L$  (AA cationic) and  $B^0$  (AA neutral), differences in expression in intestinal segments (duodenum, jejunum and ileum) of growing pigs were analyzed. 8 pigs Landrace x Duroc x Yorkshire (25 + 1.5 kg), divided into two treatments according to their sex, weight, age and litter were used: T1, basal diet supplemented with wheat free amino acids His, Ile, Trp, Leu, Lys, Met, Phe, Thr and Val (AAL) and T2, diet wheat-soybean (amino acids are included in the soy protein, AAP). Both diets were formulated to meet 100% of NRC requirements for growing pigs. The experiment lasted 21 days. The results of expression in each of the segments of intestinal mucosa were: duodenum,  $b^{0,+}$  transporter expression was higher in pigs with intact protein ( $P = 0.036$ ) compared with diet free AA; expression ileum  $y^+L$  transporter tended to be higher in pigs with free AA ( $P = 0.98$ ). Transporter expression was higher than in the other jejunal intestinal segments. In conclusion, the way the AA are added in the diet affects the expression of each transporters AA in the different intestinal segments.

Keywords: amino acids,  $b^{0,+}$ ,  $y^+L$  and  $B^0$

## 1. INTRODUCCIÓN

Una función importante de la producción animal es proveer proteína de alta calidad para la alimentación humana. Por ello es necesario mejorar la nutrición de los cerdos y aumentar su eficiencia productiva. Una estrategia para conseguir ambos propósitos consiste en diseñar programas de alimentación con dietas bajo el concepto de “proteína ideal”, que se refiere a la cantidad de proteína en la dieta, que debe tener una adecuada relación de los aminoácidos (AA) cubriendo las necesidades del animal tomando como referencia a Lisina (Lys) (Lewis, 2001), que es el primer aminoácido limitante en la mayoría de las dietas con base a cereal-pasta de soya para cerdos (NRC, 1998) no obstante arginina (Arg) y leucina (Leu) son suministrados en exceso. Arg y Lys son absorbidos por el enterocito, con una alta afinidad, por transportadores  $b^{0,+}$  independientes de Na (Majumder *et al.*, 2009). El sistema  $b^{0,+}$  es el transportador más importante para AA catiónicos expresado en células epiteliales (Palacin *et al.*, 2001). El sistema  $b^{0,+}$  intercambia Leu por Lys (Torras-Llort *et al.*, 2001), indicando que la absorción intestinal de Lys es acoplada con el flujo de salida de Leu.

Debido a que los AA unidos a proteína deben ser liberados por enzimas pancreáticas e intestinales antes de su absorción, los AA libres pueden ser absorbidos rápidamente y su disponibilidad para la síntesis de proteína podría ser más alta (Rerat *et al.*, 1992). Hatzoglou *et al.* (2004), realizaron estudios *in vitro*, encontrando que la expresión de transportadores de AA catiónicos se reguló por el contenido de AA catiónicos. Asumiendo que la expresión de los transportadores de AA representa plenamente su actividad (Dave *et al.*, 2004; Hatzoglou *et al.*, 2004); esto es asumiendo que la

concentración de AA libres en el contenido intestinal y el fluido extracelular de hígado y músculo afecta la absorción y la entrada celular de AA en cerdos, que a su vez puede afectar su disponibilidad y el rendimiento de los cerdos. Estudios recientes indican que el nivel de AA en dietas típicas para cerdos afecta la expresión de sus transportadores específicos a nivel celular (García-Villalobos *et al.*, 2012; Cervantes-Ramírez *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2013). Debido a que los AA en proteínas intactas de la dieta están disponibles para absorción en intestino delgado tiempo después de los AA libres, se especula que la abundancia de sus transportadores es diferente cuando se incorporan en forma libre.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA NUTRICIÓN EN CERDOS**

La nutrición porcina es una ciencia en evolución permanente. Lo demuestran la enorme cantidad de trabajos científicos que se publican cada año y el gran número de equipos de investigación que en diferentes universidades, empresas y otros centros en todo el mundo están trabajando en líneas de investigación relacionadas con esta área. Como consecuencia, en los últimos años produjeron avances importantes en los sistemas de evaluación nutricional de materias primas, en la estimación y el conocimiento de los requerimientos de los animales, en la tecnología de fabricación de piensos, o en el tipo de materias primas y aditivos que se utilizan en las dietas (Borja y Mendel, 1998). La alimentación de los animales en el sistema intensivo representa del 65 al 70 % del costo de producción, por lo que debe ser muy eficiente en el uso de los ingredientes y la formulación de sus dietas, aunado a una buena determinación de los requerimientos nutricionales y el análisis correcto del contenido de nutrientes. Los requerimientos están influenciados por una combinación del potencial de crecimiento y el consumo voluntario, los cuales requerirán cambiar la concentración del nutriente en la dieta y conocer los requerimientos de los cerdos en base a una cantidad por día (Dritz *et al.*, 1997).

## 2.2. PROTEÍNA INTACTA EN LA DIETA DE CERDOS

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

Los animales requieren dietas que contengan un nivel de proteína adecuado para su óptimo crecimiento. Katz *et al.* (1973) alimentaron cerdos en crecimiento con dietas maíz-pasta de soya con 16% de PC, es decir 3 unidades debajo de su requerimiento de proteína, y observaron una menor ganancia de peso comparado con los cerdos alimentados con dietas con los mismos ingredientes pero con 19% de proteína cruda. Esto indica la necesidad de ofrecer a los cerdos la cantidad de proteína que requieren. Por otra parte es importante tomar en cuenta los ingredientes de las dietas para evitar un comportamiento productivo bajo, ya que, animales que se alimentaron con dietas sorgo-pasta de soya tuvieron un comportamiento productivo diferente los que fueron alimentados con maíz-pasta de soya (Trujillo *et al.*, 2007). En ese caso, debido a que el perfil de aminoácidos de ambos granos es diferente, se estima que los animales que recibieron la dieta con sorgo, emplearon menos eficientemente los AA de la dieta, y a que el sorgo contiene otros factores antinutricionales (taninos) que no están presentes en el maíz e interfieren con la digestión y la absorción de la proteína (de Blas *et al.*, 1999).

## **2.3. AMINOÁCIDOS EN LA NUTRICIÓN DE CERDOS**

Los aminoácidos son las principales unidades estructurales de las proteínas, estos se unen para formar cadenas de péptidos y proteínas. En general, existen 20 aminoácidos diferentes en las proteínas. La función principal de los aminoácidos de la dieta es que estos sean empleados para sintetizar las proteínas de los tejidos en los animales (Lewis 2001). Además, se ha propuesto que ciertos aminoácidos se consideren como moléculas funcionales de gran importancia para el metabolismo, por ejemplo pueden actuar como moléculas de señalización para regular la traducción del ARNm (Wu G, 2009), otros están implicados en la regulación de la función inmune directa o indirectamente (Li *et al.*,2007); y algunos son precursores importantes para la síntesis de neurotransmisores y hormonas ( Wu G., 2009; Heger J. 2003).

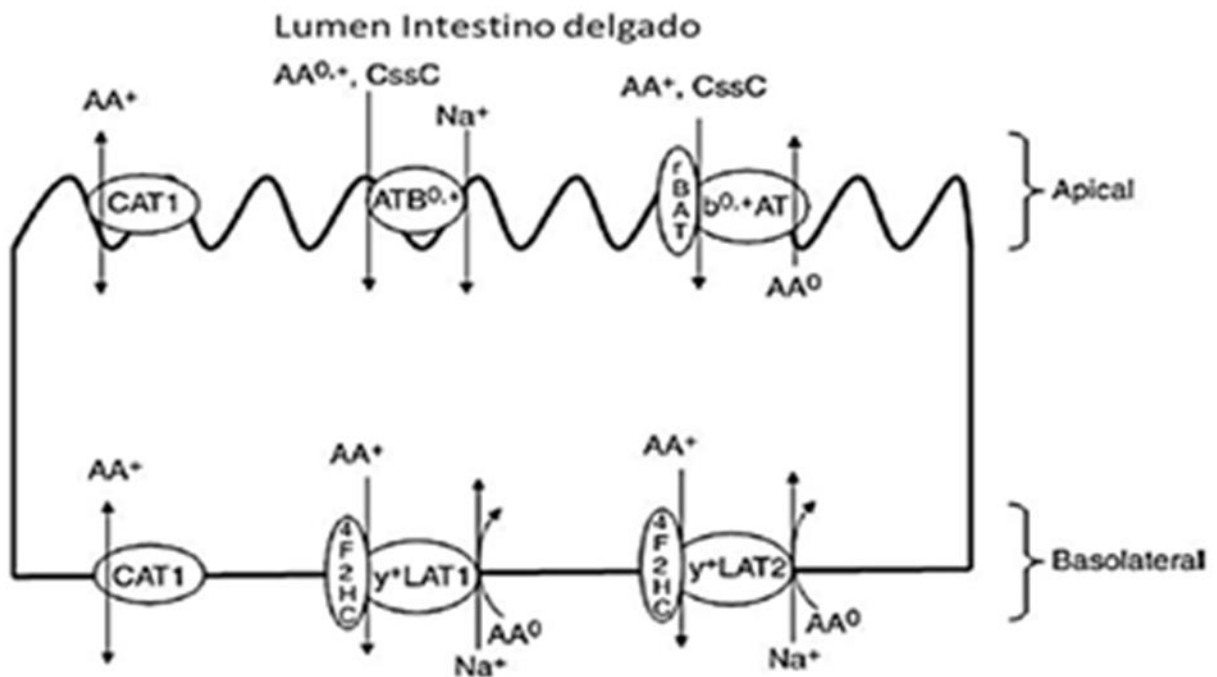
### **2.3.1. AMINOÁCIDOS ESENCIALES Y NO ESENCIALES**

De acuerdo a las necesidades de AA en la dieta de los animales, los AA se clasifican en nutricionalmente esenciales (AAE) y no esenciales (AANE). AA esenciales son los AA que no pueden ser sintetizados de *novo* por el organismo en las cantidades y velocidad que este los requiere, por lo que deben ser proporcionados en la dieta; los AA no esenciales si pueden sintetizar de *novo* en cantidades adecuadas para cumplir con los requisitos del organismo (El Idrissi 2008; Lupi et al. 2008; Phang et al. 2008). El metabolismo anormal de un AA perturba la homeostasis del cuerpo entero, el crecimiento y el deterioro del desarrollo, e incluso puede causar la muerte (Orlando *et al.*, 2008; Willis *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2004c). Por lo tanto, el uso eficiente de los AA,

mejora el crecimiento y reduce la adiposidad en los animales (Suenaga *et al.*,2008 ; Wu *et al.*, 2007a , b , c ).

## **2.4 ABSORCIÓN INTESTINAL**

Después de la digestión, los péptidos resultantes y aminoácidos son absorbidos por los enterocitos del intestino delgado (Adibi *et al.*, 1967). Dentro de los enterocitos los péptidos son hidrolizados, y los aminoácidos resultantes se liberan al torrente sanguíneo. En sangre, los aminoácidos son transportados a los tejidos en donde sirven para la síntesis de nuevas proteínas, como precursores de moléculas bioactivas, y para la generación de energía (Liao *et al.*, 2009) (Figura 1). En el riñón, los aminoácidos libres se filtran y reabsorben posteriormente para evitar el desperdicio de metabolitos valiosos (Christensen, 1990)



### Flujo sanguíneo

**Figura 1.** Modelo hipotético de mamífero asociado a proteínas transportadoras de AA catiónicos en células epiteliales de intestino delgado. La localización subcelular y la dirección predominante del flujo del sustrato se representa para cada unidad de transporte. AA+= AA Cationico; AA<sup>0,+</sup>= AA catiónico y neutral; CysC= Cistina (Liao 2009)

La absorción de AA de la digesta se lleva a cabo en el intestino delgado (Bergen, 1978; Krehbiel). El transporte de aminoácidos para su ingreso o salida de la célula es realizado por varias proteínas de membrana que se conocen como "sistemas de transporte de proteínas", estos son similares en varios tipos de células. Por primera vez Oxender y Christensen (1963) reconocieron, en células no epiteliales, que los sistemas de transporte de AA aceptan grupos de éstos con características comunes en lugar de AA individuales.



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

En resumen, los transportadores de AA permiten que los AA estén disponibles en la célula para la síntesis de proteína, regulación del metabolismo, crecimiento celular y producción de energía. Por lo que además actúan equilibrando la concentración de aminoácidos a nivel celular (Whittemore, 2001).

## **2.5. MECANISMO Y TRASPORTE DE AMINOÁCIDOS**

Actualmente, de acuerdo con su función, y de acuerdo con (Gasol, 2004), los transportadores de aminoácidos se pueden clasificar en:

a) Transportadores de alta capacidad de acumulación (EAAT, transportadores acoplados a Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>): es el caso de los transportadores de neurotransmisores (sistema XAG<sup>-</sup>, sistema Gly), que mantienen altas concentraciones de gradiente de sustratos en el riñón; o los transportadores apicales que median la reabsorción de aminoácidos en el epitelio (sistema B<sub>0,+</sub>).

b) Transportadores de débil capacidad de acumulación (ATA, SN, CAT, TAT): son transportadores asociados al cotransporte de Na<sup>+</sup> o H<sup>+</sup>, o bien uniporters. Parecen ser implicados en mantener altas concentraciones citosólicas de aminoácidos no esenciales (sistema A, sistema N) para permitir posteriormente la entrada de

aminoácidos esenciales por otros transportadores (intercambiadores). La abundancia de uniporters (sistema y<sup>+</sup>, sistema T) es muy baja debido, a quizás ser un mecanismo que no protege a la célula de la pérdida de metabolitos importantes ya que cambios en el contenido de aminoácidos en el plasma se trasladan al contenido intracelular.

c) Antiporters o intercambiadores (LAT, y<sup>+</sup>LAT, xCT, b<sup>0,+</sup>AT): constituyen la gran mayoría de los transportadores de aminoácidos en mamíferos. Preferentemente, intercambian aminoácidos no esenciales por aminoácidos esenciales. Permiten generar asimetrías, clave para el flujo vectorial de aminoácidos. Un ejemplo es la reabsorción de aminoácidos en el riñón (sistema b<sup>0,+</sup>, sistema L, sistema y<sup>+</sup>L).

### 2.5.1. SISTEMA B<sup>0,+</sup>AT/RBAT

El principal transportador de aminoácidos catiónicos en la membrana apical de los riñones y el intestino es un transportador heteromérico rBAT/b<sup>0,+</sup>AT (Palacin *et al.*, 2001) (cuadro 1). Es el equivalente molecular del sistema de transporte renal e intestinal de AA catiónicos. La proteína rBAT es una glicoproteína de membrana tipo II con un gran dominio extracelular que está relacionado con glucosidasas bacterianas. Se compone de 685 aminoácidos y está altamente glucosilada (Bertran *et al.*, 1993, Tate *et al.*, 1992, Wells RG, Hediger MA. 1992). El b<sup>0,+</sup>AT es una proteína transmembrana politópica, compuesto de 487 aminoácidos (masa molecular -50 kDa) y 12 hélices transmembrana (Chairoungdua *et al.*, 1999; Feliubadalo *et al.*, 1999, Pfeiffer *et al.*, 1999). Las subunidades rBAT y b<sup>0,+</sup>AT están unidas por un puente disulfuro. Debido a su masa molecular, rBAT se conoce como la cadena pesada y b<sup>0,+</sup> es la

cadena ligera. Ambas subunidades tienen que ser coexpresadas para llegar a la membrana plasmática. La proteína rBAT por sí solo parece ser relativamente inestable y se degrada rápidamente (Bauch C. y Verrey F. 2002; Reig *et al.*, 2002). La coexpresión de  $b^{0,+}$ AT estabiliza rBAT y promueve el tráfico a la membrana apical. En contraste con la proteína rBAT,  $b^{0,+}$ AT es estable, pero permanece en el retículo endoplásmico (Bauch *et al.*, 2002). El transportador tiene la especificidad de sustrato de sistema  $b^{0,+}$  como se describe originalmente en blastocitos de ratón (Van Winkle *et al.*, 1998). La cistina y los aminoácidos catiónicos se transportan con los valores de  $K_m$  de  $\sim 100\mu M$ , mientras que los aminoácidos neutros tienen valores de  $K_m$  ligeramente más altos (Palacin M. 1994). La captación de aminoácidos neutros genera una corriente hacia el exterior (es decir, un flujo de salida de cargas positivas) en oocitos, mientras que los aminoácidos catiónicos inducen corrientes hacia el interior (Ahmed *et al.*, 1995, Busch *et al.*, 1994). Fisiológicamente, rBAT/ $b^{0,+}$ AT actúa como un mecanismo de absorción de los aminoácidos catiónicos y cistina acoplados al flujo de salida de los aminoácidos neutros. Como se ha señalado anteriormente, rBAT por ser un complejo de cadena ligera se degrada rápidamente. El rBAT/ $b^{0,+}$ AT muestra ligeramente mayor actividad de transporte en la presencia de  $Na^+$  que en su ausencia, lo que demuestra su potencial para mediar el transporte de  $Na^+$ -estimulado. La expresión de rBAT está regulada por señales nutricionales. Sorprendentemente, el aspartato es particularmente un buen inductor de la subunidad rBAT transportador de aminoácidos catiónicos (Segawa *et al.*, 1997).

## 2.5.2. SISTEMA Y+LAT-1/4F2HC

El transportador  $y^+$ LAT1/4F2hc (cuadro 1) es un mediador de flujo de salida de aminoácidos cationicos a partir de células epiteliales (Broer S. 2008). La cadena ligera 4F2hc esta vinculado para llevar a cabo una variedad de funciones de transporte: 4F2hc/LAT1 y 4F2hc/LAT2, dos variantes del sistema de transporte de L (un transportador de aminoácidos neutros grandes, ejemplificada por leucina). Ambas isoformas llevan a cabo el intercambio de aminoácidos neutros, la primer forma prefieren aminoácidos neutros grandes, mientras que el segundo transporta una gran variedad de aminoácidos neutros. Los transportadores de aminoácidos heteroméricos incluyendo 4F2hc / $y$ +LAT1 y 4F2hc/ $y$ +LAT2 (SLC3A2/SLC7A6 y SLC3A2/SLC7A7) corresponde al sistema de transporte de aminoácidos  $y$ +L, fisiológicamente, este transportador regula el flujo de salida de un aminoácido dibásico, a cambio de un aminoácido neutro extracelular más  $Na^+$ , con una  $K_m$  aparente de  $\sim 20$  M (Torrents et al 1998, Pfeiffer et al 1999, Kanai et el 2000). Se especula que el ion  $Na^+$  reemplaza la carga positiva de la cadena lateral de aminoácidos dibásicos cuando se transportan aminoácidos neutros. En apoyo de esta noción, la afinidad de neutro, pero no cationicos, aminoácidos aumenta por aproximadamente dos órdenes de magnitud en la presencia de  $Na^+$ . Similar a sistema  $b^{0,+}$ , la aparente afinidad por sustratos también es menor en el sitio de unión intracelular para 4F2hc /  $y$  + LAT1 (Kanai et el 2000).

### 2.5.3. SISTEMA B<sup>0</sup>AT-1

El sistema molecular B<sup>0</sup> (cuadro 1) es el principal transportador de aminoácidos neutros en el riñón y el intestino, es B<sup>0</sup>AT1 (SLC6A19; Broer 2004), una proteína de 634 aminoácidos. Actualmente, no se han reportado variantes de empalme del transportador. De acuerdo con estudios funcionales, B<sup>0</sup>AT1 transporta los aminoácidos neutros, aunque en distinta medida. De acuerdo con estudios parciales en el intestino (Preston *et al.*, 1974), los valores de V<sub>max</sub> parecen ser bastante similar, pero su afinidad es diferente para cada aminoácido. El orden de preferencia es Met = Leu = Ile = Val > Gln = Asn = Phe = Cys = Ala > Ser = Gly = Tyr = Thr = His = Pro > Trp > Lys. El transportador demuestra cierta afinidad por lisina e interactúa con los aminoácidos aniónicos a pH bajo (Schultz SG, Curran PF., 1970). La afinidad de sustrato aumenta en condiciones de hiperpolarización. La hibridación *in situ* y el análisis inmunocitoquímico mostró que el transportador se expresa en el túbulo contorneado proximal del riñón (Broer *et al.*, 2004, Romeo *et al.*, 2006) y en el intestino delgado, con incremento en su expresión desde el duodeno hasta el íleon (Romeo *et al.*, 2006, Terada *et al.*, 2005). El transportador se limita a la membrana apical de las vellosidades, y consistente en los enterocitos diferenciados (Broer *et al.*, 2004,). Además de riñón e intestino, este transportador se expresa en bazo y pulmón.

Cuadro 1. Sistemas de transporte de aminoácidos en mamíferos (Gasol, 2004)

Sistema de transporte	Isoformas	Mecanismo	Sustratos
$b^{0,+}$	$b^{0,+}$ AT/rBAT	Antiporte	Lys, Arg, Ala, Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, His, Met, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp, Cys-
$B^0$	B0AT-1	Cotransporte 2Na+/AA	Leu, Ile, Gln, Phe, Ala, Pro, Cys, Val, Met, Ser, Asn, (His, Gly, Thr, Trp, Tyr)
$y^+L$	y+LAT-1/4F2hc	Antiporte	Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu
	y+LAT-2/4F2hc	1Na+/AA	Lys, Arg, Gln, His, Met, Leu, Ala, Cys

### **3. HIPÓTESIS**

Debido a que los AA en proteínas intactas de la dieta están disponibles para absorción en intestino delgado varios minutos después que AA libres, se especula que la abundancia de sus transportadores es diferente dependiendo de la forma en que estos se incorporan en la dieta.

### **4. OBJETIVO**

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la forma (libre vs. proteína intacta) en que se incorporan los AA a la dieta sobre la expresión de los transportadores  $b^{0,+}$ ,  $y^+$  L (AA catiónicos) y  $B^0$  (AA neutros) en intestino delgado; y analizar las diferencias en su expresión en los segmentos de duodeno, yeyuno e íleon.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en la Unidad Experimental Porcina en el área Fisiología y Metabolismo del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. Esta área cuenta con corrales individuales con un clima controlado, bebedero automático y comedero de tipo tolva. El análisis molecular de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del mismo instituto.

### **4.1 ANIMALES**

Se utilizaron 8 cerdos cruzados (Landrace x Hampshire x Duroc), con un peso vivo inicial de  $25 \pm 1.5$  kg., distribuidos aleatoriamente en dos tratamientos de acuerdo a su peso inicial, sexo, edad y camada. Estos animales se alojaron en corraletas individuales de 0.6 X 1.2 m, y tuvieron libre acceso al alimento y al agua de bebida durante todo el experimento.

### **4.2 DIETAS**

Los tratamientos fueron dos dietas (cuadro 2) en las que los AA se incluyeron en dos formas, mayormente libres (AAL) o totalmente como proteína intacta (AAP): AAL, consistió en 91.5% de trigo, se considera una dieta baja en proteína pero adicionada con Fen, His, Ile, Leu, Lys, Met, Trp, Tre y Val; AAP, dieta con 64.9% de trigo y 30.3% de pasta de soya. La dieta con AAP se formuló para cubrir 100% el requerimiento de Lys por lo que excedía el de los otros AA esenciales; la dieta AAL se formuló para cubrir el requerimiento de todos los AA esenciales bajo el concepto de proteína ideal. Ambas dietas se adicionaron con vitaminas y minerales de acuerdo al requerimiento de los cerdos en esa etapa de crecimiento (NRC, 2012).



La fase experimental fue de 21 días con un periodo previo de 7 días, al cabo de los cuales los cerdos fueron sacrificados.

Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales		
Ingredientes (%)	Dietas	
	AAL	AAP
Trigo	91.46	64.90
Pasta de soya	4.00	30.30
L-Arg HCl		
L-Lys HCl	0.80	
L-Thr	0.27	
DL-Met	0.11	
L-Trp	0.04	
L-Phe	0.09	
L-Leu	0.25	
L-Ile	0.13	
L-His	0.08	
L-Val	0.17	
Carbonato de calcio	1.40	1.25
ortofosfato	0.65	1.00
Sal ionizada	0.35	0.35
Vit0. Min. Premix	0.20	0.20
Aceite canola		2.00
Total	100	100

### **5.3 SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS**

Al final del experimento los cerdos fueron sacrificados y se tomaron muestras aproximadamente 0.5 g de raspado de la mucosa de duodeno, yeyuno e íleon, mismas que se colocaron en tubos de 2 ml previamente identificados. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -82°C hasta su procesamiento en laboratorio.

### **5.4 ANÁLISIS DE LABORATORIO**

#### **5.4.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y RETROTRANSCRIPCIÓN**

##### **5.4.1.1 EXTRACCIÓN TOTAL DE ARN**

Las muestras de la mucosa intestinal de duodeno, yeyuno e íleon se procesaron para extraer ARN de acuerdo con el protocolo descrito por Méndez et al., 2011. El ARN purificado se eluyó en 30 µl de agua destilada libre de RNAsas y se almacenó a -82°C. La concentración de ARNtotal se determinó por espectrofotometría (Helios β, Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA) a 260 nm, y la pureza del ARN se evaluó mediante el uso de la relación A260/A280, que varió desde 1.8 a 2.0 (Sambrook y Russell, 2001). La integridad del ARN total se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Todas las muestras de ARN tuvieron buena calidad con una relación de ARNr 28S:18S alrededor de 2.0:1 (Sambrook y Russell, 2001).

#### **5.4.1.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

Aproximadamente 5 µl de ARN total se trataron con 1 U de ADNasa I ; (1 U por µl; Invitrogen) en 6 µl de buffer para transcripción reversa 5x y 23 µl de agua tratada con DEPC; se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos a 70 °C para detener la reacción. La transcripción reversa se inició con las muestras de ARN tratadas con ADNasa, se adicionó 1 µl de oligonucleótidos aleatorios (hexaprimer 150 ng por µl, Invitrogen) y 1 µl de solución de dNTPs (cada uno 10µM), la reacción se incubó a temperatura ambiente y enseguida se enfrió en hielo durante 1 minuto; se agregaron 3 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de inhibidor de ribonucleasa (40U por µl; Thermo scientific), se agregó a la reacción 2 µl de buffer para transcripción reversa 5x y se incubó a 42 °C durante dos minutos para estabilizar la reacción antes de la adición de 1 µl de enzima reversa transcriptasa (200 U por µl; Revert Aid H Minus, Thermo scientific). La reacción se incubó a 42 °C durante 50 minutos y posteriormente a 70 °C durante 15 minutos para detener la reacción. Las muestras de ADNc se cuantificaron espectrofotométricamente y diluyeron a una concentración final de 50 ng por µl.

#### **5.4.2 REACCIÓN DE LA CADENA DE POLIMERASA PUNTO FINAL**

Para determinar la calidad de los ADNc se utilizaron oligonucleótidos específicos para los genes en estudio (Cuadro 3), y se llevaron a cabo ensayos de PCR punto final (Sambrook y Russell, 2001) en un termociclador Mastercycler gradient Eppendorf con el programa descrito en el cuadro 4.

Cuadro 3. Oligonucleótidos específicos empleados para las reacciones de PCR y PCR cuantitativo.

ARNm	Primer	Localización (pb)	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
b <sup>0,+</sup> AT (SLC7A9) (GenBank: EF127857)				
	Sentido	1-19	5'CGGAGAGAGGATGAGAAGT3'	562
	Antisentido	545-562	5'GCCCGCTGATGATGATGA3'	
y +L (SLC7A7)( Gen Bank:)				
	Sentido	664	5'TCAAGTGGGGAACCCTGGTA3'	259
	Antisentido	922	5'ATGGAGAGGGGCAGATTCCT3'	
B0 (SLC 6A19) (Gen Bank:)				
	Sentido	9	5'TCTGTCCACAACAACACTGCGAG3	209
	Antisentido	218	5'CAGCGAAGTTCTCCTGCGTC3'	

Cuadro 4. Programa utilizado para la técnica de PCR punto final

Etapa	Tiempo hh:mm:ss	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	00:05:00	95
40 Ciclos:		
Desnaturalización	00:00:45	94
Alineación	00:00:45	56
Elongación	00:01:00	72
Elongación Final	00:05:00	10
Incubación	Indefinido	10

### **5.4.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR)**

La expresión de  $b^{0,+}$ ,  $y^{+L}$  y  $B^0$  se estimó por PCR cuantitativo (qPCR) usando SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Corp., Glen Burnie, MD, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real Cromo 4-ADN (Bio-Rad, Herefordshire, England) con el software MJ Opticon Monitor 3.1. El equipo se calibró con una curva estándar usando el ARNr 18S clonado en el vector TOPO 4.0, el cual se cuantificó previamente para emplear diluciones seriadas que se usaron como puntos de referencia en la curva. Las reacciones para PCR cuantitativo contenían 50 ng de ADNc, 0.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido específico, 12.5  $\mu$ l de 2x SYBR green/ROX qPCR Master Mix, y agua libre de ADNasa/ARNasa para completar el volumen final de 25  $\mu$ l. Las condiciones de la PCR utilizadas en la amplificación y la cuantificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización (95 °C por 1 min), seguido por 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, alineación 56 °C 15 segundos y extensión a 72 °C durante 1 min) y un programa de curva de desnaturalización (60°C a 90°C). La fluorescencia se midió al final de cada ciclo y cada 0.2 °C durante el programa de desnaturalización.

### **5.4.4 ANÁLISIS QUÍMICOS**

La concentración de AA libres en suero se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito por Sunde et al. (2003). Las muestras de sangre se centrifugaron a 1,000 x g, 4°C por 1 min para separar suero de células sanguíneas, y el suero fue desproteninizado con una unidad de filtrado Millipore Ultrafree-MC 10,000 NMWL

(Millipore, Bedford, MA, USA) a 5,000 x g, 4°C por 30 min. El contenido de AA en los ingredientes alimenticios, dietas y suero se determinó en los laboratorios de Evonik Industries (Hanau-Wolfgang, Germany), de acuerdo con el procedimiento de Llames and Fontaine (1994).

### **5.4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de la expresión genética, se realizó con el programa estadístico Statistix 9.0, mediante la aplicación de un análisis contrastes polinomiales: B0 (Duo vs Yey , Yey vs Ile, Duo vs Ile),  $b^{0,+}$  (Duo vs Yey , Yey vs Ile, Duo vs Ile),  $y^+L$  (Duo vs Yey , Yey vs Ile, Duo vs Ile).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 EXPRESIÓN DE ARN

En este estudio, se normalizó la expresión relativa de los ARNm de los transportadores de AA  $b^{0,+}$ ,  $y^{+L}$ ,  $B^0$ , con la expresión del ARNr 18S. Lo anterior responde a estudios que revelan que la expresión de ARNr 18S es muy estable y su contenido puede ser usado como control endógeno para normalizar la expresión de otros genes en respuesta a varios estímulos (Liao *et al.*, 2009). Los resultados de la expresión de los ARNm de  $b^{0,+}$ ,  $y^{+L}$  y  $B^0$  en duodeno, yeyuno e íleon se presentan en el Cuadro 5. La expresión de  $b^{0,+}$  en duodeno fue mayor en los cerdos que recibieron la dieta con AA en forma de proteína intacta ( $P=0.036$ ), pero no hubo diferencia en yeyuno e íleon. El transportador  $y^{+L}$  tendió a expresarse más en íleon de cerdos con la dieta AAL ( $P=0.098$ ) pero en duodeno y yeyuno no hubo diferencias. La expresión de  $B^0$  no se afectó por la forma en que se incorporaron los AA en la dieta. La expresión de los tres transportadores fue mayor en yeyuno que en duodeno e íleon ( $P<0.001$ ).

### 6.2 CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA

La concentración promedio de los AA esenciales y no esenciales libres en suero de cerdos alimentados con dietas formuladas con AA libres o ligados a proteína se presenta en el Cuadro 6. La concentración sérica de Arg, His, Ile and Fen fue superior en cerdos alimentados con la dieta que contenía los AA ligados a proteína, pero la de Lis y Met fue superior en los cerdos con la dieta que contenía AA libres. Leu y Tre sérica no se afectaron por la forma en que los AA se incluyeron en la dieta. Notablemente, la concentración sérica de Lis y Met fue superior en los

Cuadro 5. Expresión de los transportadores de AA  $b^{0,+}$ ,  $y^{+L}$ ,  $B^0$ , en intestino delgado de cerdos alimentados con dietas conteniendo aminoácidos libres (AAL) o totalmente en proteína intacta (AAP); unidades arbitrarias, relación mRNA:18S rRNA.

		AAL	AAP	EEM	P=
$b^{0,+}$	Duodeno	0.007	0.014	0.002	0.036
	Yeyuno	0.018	0.025	0.003	0.118
	Íleon	0.012	0.010	0.002	0.480
$y^{+L}$	Duodeno	0.018	0.016	0.003	0.600
	Yeyuno	0.033	0.029	0.003	0.435
	Íleon	0.025	0.016	0.003	0.098
$B^0$	Duodeno	0.010	0.012	0.002	0.541
	Yeyuno	0.057	0.037	0.010	0.199
	Íleon	0.017	0.015	0.003	0.631

P<0.001

cerdos que consumieron las dietas que contenían cantidades elevadas de estos AA en forma libre, mientras que la concentración de los AA que se adicionaron en forma libre en cantidades bajas o nulas fue mayor en los cerdos con la dieta que contenía AA ligados a proteína. Con respecto a los AA no esenciales, la concentración sérica de Asn y Ser was fue superior (P<0.05) en cerdos alimentados con AA libres, pero la de Glu fue mayor (P<0.05) y Gln tendió a ser mayor (P>0.10) en los cerdos con la dieta conteniendo solo AA ligados a proteína. La concentración sérica de Ala, Asp, Gli y Pro no se afectó por la forma en que se adicionaron los AA a la dieta.



Cuadro 6. Concentración de aminoácidos libres en suero de cerdos alimentados con dietas formuladas parcialmente con aminoácidos libres (AAL) o ligados a proteína.(AAP)

	AAL	AAP	SEM 1	Valores-P
Aminoácido esencial				
Arg	2.66	4.74	0.549	0.037
His	0.93	1.80	0.183	0.015
Ile	1.69	3.09	0.247	0.007
Leu	2.55	3.41	0.472	0.243
Lys	4.85	1.79	0.273	0.002
Met	0.81	0.26	0.083	0.003
Phe	1.34	2.46	0.192	0.006
Thr	2.19	2.02	0.274	0.678
Val	3.15	4.48	0.605	0.173
Aminoácido no esencial				
Ala	7.94	4.10	0.687	0.324
Asn	0.75	0.87	0.152	0.005
Asp	0.23	0.12	0.034	0.580
Gln	7.80	5.94	0.489	0.089
Glu	2.56	1.03	0.460	0.016
Gly	7.58	5.54	0.504	0.638
Pro	3.85	2.87	0.774	0.612
Ser	1.74	2.26	0.023	0.004

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 EXPRESIÓN DE b<sup>0,+</sup>

El transporte de AA catiónicos a través de la membrana celular de tejidos animales se ha estudiado extensamente (Broer 2008) pero la mayoría de esos estudios se han realizado en células especializadas (e.g. Closs et al. 2006). Aún más, la regulación en la expresión de CAT-1 se ha estudiado bajo condiciones de estrés severo, especialmente en medios de cultivo desprovistos de algunos nutrientes (Hatzoglou et al. 2004; Majunder et al. 2009). En contraste, solo algunos estudios han incluido animales completos y alimentados con ingredientes alimenticios típicos en el desarrollo de experimentos realizados para analizar la expresión de transportadores de AA catiónicos (Liao et al. 2009; Morales et al. 2011; 2013). Asimismo, es importante mencionar que la expresión de transportadores de AA catiónicos, como lo han reportado diversos autores (e.g. Dave et al. 2004; Hatzoglou et al. 2004; Broer 2008) representa su actividad funcional. Por tanto, se especula que los valores de expresión presentados en este reporte reflejan la actividad catalítica de los respectivos transportadores.

La dieta elaborada con AA libres que fue empleada en este estudio proveyó 0.63% de lisina libre; es decir, alrededor el 65% del total de la lisina digestible en íleon se suministró en forma libre. En contraste, la dieta con AA ligados a proteína no contenía ningún AA en forma libre y todos provenían de la proteína del trigo y la pasta de soya. La liberación de los AA de estas proteínas ocurre después que estas se, someten al proceso de digestión por las proteasas pancreáticas e intestinales para liberar los AA y propiciar su absorción. Por el contrario, el 65% de la lisina en la dieta con AA libres se

encontraba disponible para ser absorbida desde el momento que ingresa al intestino delgado. Así, se especulan diferencias tanto el sitio intestinal como en el tiempo de disposición de los AA para ser absorbidos, lo cual supone que tanto la expresión como la actividad de los transportadores de AA se puede afectar por la forma en que los AA (libre vs. proteína intacta) se ofrecen al animal en la dieta.

Los AA compiten para su absorción a nivel celular (Hagihira et al., 1961), por ejemplo, la entrada de AA neutros puede afectar la absorción de AA catiónicos (Broer, 2008). Recientemente se ha encontrado que la expresión de los transportadores de AA y péptidos en intestino delgado puede modificarse de acuerdo con el contenido de proteínas y AA en la dieta (Gilbert et al., 2008; Suryawan y Davis 2011)

De acuerdo con Palacín et al. (2001), b<sub>0,+</sub> es la unidad que cataliza el intercambio transmembrana de AA, el intercambio de b<sub>0,+</sub> es un sistema dibásico para los AA neutros que está acoplado con el flujo de salida de estos. La expresión de b<sub>0,+</sub> es mayor en las células epiteliales Palacín et al., (2001), de acuerdo con Grageola (2013) El transportador b<sub>0,+</sub> se expresó más en yeyuno de cerdos alimentados con la dieta BP-AA. En este estudio la expresión de b<sub>0,+</sub> en duodeno fue mayor en los cerdos que recibieron la dieta con los AA en forma de proteína intacta (P=0.036), pero no hubo diferencia en yeyuno e íleon. Se había especulado que la expresión de b<sub>0,+</sub> sería mayor en duodeno de cerdos con la dieta AAL. Sin embargo, los resultados de este estudio indican que la presencia de proteína intacta tiene un mayor efecto en la expresión de b<sub>0,+</sub> que los AA libres.

## 7.2 EXPRESIÓN DE y<sup>+</sup>L

El transportador y<sup>+</sup>LAT1/4F2hc es un mediador de flujo de salida de aminoácidos cationicos a partir de células epiteliales (Broer 2008), fisiológicamente, este transportador regula el flujo de salida de un aminoácido dibásico, a cambio de un aminoácido neutro extracelular más Na<sup>+</sup>, con una Km aparente de ~20 M (Torrents et al 1998, Pfeiffer et al 1999, Kanai et el 2000. Por lo tanto en este estudio y<sup>+</sup>L tendió a expresarse más en íleon de cerdos con la dieta AAL (P=0.098) pero en duodeno y yeyuno no hubo diferencias. De acuerdo con Liao *et al* 2009, la expresión de y<sup>+</sup>L es mayor en el borde basolateral ya controla el flujo de salida de aminoácidos hacia el torrente sanguíneo.

## 7.3 EXPRESIÓN DE B<sup>0</sup>

Estudios de animales de laboratorio han encontrado que la pequeña absorción intestinal de la mayoría de AA libre se logra mediante la función de múltiples sistemas de transporte de AA/ actividades ubicadas en las membranas del borde apical y basolateral de las células epiteliales (Bergen, 1978; Krehbiel and Matthews, 2003), B<sup>0</sup>AT1 pertenece al sistema B<sup>0</sup>, es el principal transportador apical neutro de aminoácidos en el riñón y el intestino delgado (Broer 2008). La expresión de B<sup>0</sup> no se afectó por la forma en que se incorporaron los AA en la dieta.

#### **7.4 CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA**

La concentración de AA libres en suero de cerdos proviene de la degradación de proteínas tisulares y de la ingestión de AA en la dieta que son absorbidos en el intestino delgado. De acuerdo con Adibi and Mercer (1973), las proteínas exógenas son la principal Fuente de AA libres en plasma de humanos colectada dentro de las primeras cuatro horas postprandial. En este estudio, las muestras de sangre se colectaron 2.5 horas después de la ingestión de su ración alimenticia matutina, y la concentración de AA libres en plasma se afectó de manera diferenciada por la forma en que los animales consumieron los AA (libres vs. ligados a proteína). Es decir, la concentración sérica de lisina y metionina fue superior en los animales con la dieta que contenía AA libres que los que consumieron la dieta con la totalidad de AA ligados a proteína. Aunque ambas dietas contenía porcentajes semejantes de lisina y metionina, estas diferencias se pueden atribuir al supuesto de que la proteína intacta tiene que someterse primero al proceso de digestión antes de que los AA sean liberados para su absorción, mientras que los AA libres en la dieta son absorbidos rápidamente desde que llegan al duodeno.

En contraste, la concentración sérica de arginina, histidina, isoleucina y fenilalanina fue superior en los animales que ingirieron la dieta con la totalidad de AA ligados a proteína. Esta diferencia se puede atribuir al mayor contenido de arginina, histidina y fenilalanina en la dieta con la totalidad de AA ligados a proteína con en la dieta con AA libres. Esta respuesta sugiere que la presencia de AA libres en los distintos segmentos del intestino delgado del cerdo podría afectar la expresión o la actividad de los transportadores de AA.

## **8. CONCLUSIÓN**

En conclusión, la forma en que se incluyen los AA en la dieta (libre vs. proteína intacta) afecta la expresión de transportadores de AA catiónicos y ésta es superior en yeyuno que en los otros dos segmentos intestinales. Igualmente, la forma en que los animales consumen los AA en la dieta (libres o ligados a proteína) afecta su disponibilidad (concentración sérica) para la síntesis de proteína.

## 9. LITERATURA CITADA

- Adibi SA, Gray SJ, Menden E. The kinetics of amino acid absorption and alteration of plasma composition of free amino acids after intestinal perfusion of amino acid mixtures. *Am J Clin Nutr* 20: 24–33, 1967.
- Ahmed A, Peter GJ, Taylor PM, Harper AA, Rennie MJ. Sodium-independent currents of opposite polarity evoked by neutral and cationic amino acids in neutral and basic amino acid transporter cRNA-injected oocytes. *J Biol Chem* 270: 8482–8486, 1995.
- Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS: Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *J Nutr* 2000, 130:139–145.
- Bauch C, Forster N, Loffing-Cueni D, Summa V, Verrey F. Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 278: 1316–1322, 2003.
- Bergen, W. G. 1978. Postruminal digestion and absorption of nitrogenous compounds. *Fed. Proc.* 37:1223–1227.
- Bertran J, Werner A, Chillaron J, Nunes V, Biber J, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Murer H, Palacin M. Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes *J Biol Chem* 268: 14842–14849, 1993.
- Bohmer C, Broer A, Munzinger M, Kowalczyk S, Rasko JE, Lang F, Broer S. Characterization of mouse amino acid transporter B0AT1 (slc6a19). *Biochem J* 389: 745–751, 2005.
- Borja, E., y P. Medel, 1998. Avances en la alimentación del porcino. En: XIV Curso de Especialización FEDNA.

- Broer A, Albers A, Setiawan I, Edwards RH, Chaudhry FA, Lang F, Wagner CA, Broer S. Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *J Physiol* 539: 3–14, 2002
- Broer A, Klingel K, Kowalczyk S, Rasko JE, Cavanaugh J, Broer S. Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J Biol Chem* 279: 24467–24476, 2004.
- Broer, S., 2008: Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiology Review* 88, 249–286.
- Busch AE, Herzer T, Waldegger S, Schmidt F, Palacin M, Biber J, Markovich D, Murer H, Lang F. Opposite directed currents induced by the transport of dibasic and neutral amino acids in *Xenopus* oocytes expressing the protein rBAT. *J Biol Chem* 269: 25581–25586, 1994.
- Camargo SM, Makrides V, Virkki LV, Forster IC, Verrey F. Steady-state kinetic characterization of the mouse B(0)AT1 sodiumdependent neutral amino acid transporter. *Pflügers Arch* 451: 338– 348, 2005.
- Cervantes-Ramírez, M., V. Méndez-Trujillo, B.A. Araiza-Piña, M.A. Barrera-Silva, D. González-Mendoza y A. Morales-Trejo. 2013. Supplemental leucine and isoleucine affect expression of cationic amino acid transporters and myosin, serum concentration of amino acids, and growth performance of pigs. *Gen. Mol. Res.* 12: 115-126.
- Chairoungdua A, Segawa H, Kim JY, Miyamoto K, Haga H, Fukui Y, Mizoguchi K, Ito H, Takeda E, Endou H, Kanai Y. Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type I membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 274: 28845–28848, 1999.
- Chillaron J, Estevez R, Mora C, Wagner CA, Suessbrich H, Lang F, Gelpi JL, Testar X, Busch AE, Zorzano A, Palacin M. Obligatory amino acid exchange via systems bo,<sub>o</sub>-like and y<sub>L</sub>-like. A tertiary active transport mechanism for renal



- reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J Biol Chem* 271: 17761–17770, 1996.
- Christensen, H.N. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev.* 70:43-77.
- Dave, M.H., Schulz, N., Zecevic, M., Wagner, C.A., Verrey, F., 2004. Expression of heteromeric amino acid transporters along the murine intestine. *J. Physiol.* 558, 597-610.
- de Blas, C., G. G. Mateos, y P. G. Rebollar. 1999. Normas FEDNA para la formulación de piensos compuestos. Ed. Pancosma, Madrid, España. pp: 41-44.
- Deves R, Chavez P, Boyd CA. Identification of a new transport system ( $\gamma_L$ ) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol* 454: 491–501, 1992.
- Dritz S.S., M.D. Tokach, R.D. Goodband, y J.L. Nelssen. 1997. General Nutrition Principles for Swine, MF2298. Una serie de seis. Kansas State University .
- El Idrissi A (2008) Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. *Amino Acids* 34:321–328
- Eleno N, Deves R, Boyd CA. Membrane potential dependence of the kinetics of cationic amino acid transport systems in human placenta. *J Physiol* 479: 291–300, 1994.
- Feliubadalo L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Centola M, Aksentijevich I, Kreiss Y, Goldman B, Pras M, Kastner DL, Pras E, Gasparini P, Bisceglia L, Beccia E, Gallucci M, de Sanctis L, Ponzzone A, Rizzoni GF, Zelante L, Bassi MT, George AL Jr, Manzoni M, De Grandi A, Riboni M, Endsley JK, Ballabio A, Borsani G, Reig N, Fernandez E, Estevez R, Pineda M, Torrents D, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M. Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit ( $\text{bo}_{AT}$ ) of rBAT International Cystinuria Consortium. *Nat Genet* 23: 52–57, 1999.

- Fernández E, Carrascal M, Rousaud F, Abian J, Zorzano A, Palacin M, Chillaron J. rBAT-b(0,\_)AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F54 F548, 2002.
- Fontaine, J. 1995. Assays for amino acids: standardising methods throughout the EU. *Feed Int.* 16: 16-21.
- García-Villalobos, H., A. Morales-Trejo, B.A. Araiza-Piña, J.K. Htoo y M. Cervantes-Ramírez. 2012. Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97:263-270.
- 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
- Gilbert ER, Li H, Emmerson DA et al (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
- Grageola N. F. 2013. Comportamiento productivo y expresión de proteínas transportadoras de aminoácidos catiónicos en cerdos alimentados con dietas altas en proteína o bajas en proteína suplementadas con aminoácidos libres. Tesis de Doctorado. Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, B. C., México
- Hagihira, H.; Lin, E. C.; Samiy, A. H.; Wilson, T. H., 1961: Active transport of lysine, ornithine, arginine and cystine by the intestine. *Biochemical Biophysical Research Communication* 4, 478–481.
- Hatzoglou, M., Fernandez, J., Yaman, I., Closs, E., 2004. Regulation of cationic amino acid transport: The story of the CAT-1 transporter. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 377–99.

Heger J: Essential to non-essential amino acid ratios. In *Amino Acids in Animal Nutrition*. Edited by D'Mello JPF. Edinburgh, UK: CABI Publishing; 2003:103–204.

Kanai Y, Fukasawa Y, Cha SH, Segawa H, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Kim JY, Miyamoto K, Takeda E, Endou H. Transport properties of a system y<sub>L</sub> neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J Biol Chem* 275: 20787–20793., 2000.

Katz R. S., D. H. Baker, C. E. Sasse 1 , A. H. Jensen and B. G. Harmon. EFFICACY OF SUPPLEMENTAL LYSINE, METHIONINE AND ROLLED OATS FOR WEANLING PIGS FED A LOW-PROTEIN CORN-SOYBEAN MEAL DIET *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE*, vol. 37, no. 5, 1973

Kerr, B.J., Southern, L.L., Bidner, T.D., Friesen K.G., 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.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Mtor interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110: 163–175, 2002.

Krehbiel, C. R., and J. C. Matthews. 2003. Absorption of amino acids and peptides. Pages 41–70 in *Amino Acids in Animal Nutrition*. 2nd ed. J. P. F. D'Mello, ed. CAB International, Wallingford, UK..

Lewis AJ (2001) Amino acids in swine nutrition. In Lewis A, Southern JL (Eds.) *Swine Nutrition*. 2nd ed. CRC Press. New york, USA. Pp. 151-186

Li P, Yin YL, Li DF, Kim SW, Wu G: Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 2007, 98:237–252.

Liao, S.F., Vanzant, E.S., Harmon, D.L., McLeod, K.R., Boling, J.A., Matthews, J.C., 2009. Ruminant and abomasal starch hydrolysate infusions selectively decrease

- the expression of cationic amino acid transporter mRNA by small intestinal epithelia of forage-fed beef steer. *J. Dairy Sci.* 92, 1124–1135.
- Llames, C. R., Fontaine, J. 1994. Determination of amino acids in feeds: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 77: 1362-1402.
- Lupi A, Tenni R, Rossi A et al (2008) Human prolidase and prolidase deficiency. *Amino Acids* 35:739–752
- Majumder, M., Yaman, I., Gaccioli, F., Zeenko, V.V., Wang, C., Caprara, M.G., Venema, R.C., Komar, A.A., Snider, M.D., Hatzoglou, M., 2009. The hnRNA-Binding Proteins hnRNP L and PTB Are Required for Efficient Translation of the Cat-1 Arginine/Lysine. Transporter mRNA during Amino Acid Starvation. *Mol. Cell Biol.* 29, 2899–2912.
- Méndez, V., Avelar, E., Morales, A., Cervantes, M., Araiza, A., González, D., 2011. A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genet. Mol. Res.* 10, 3251-3255.
- Mora C, Chillaron J, Calonge MJ, Forgo J, Testar X, Nunes V, Murer H, Zorzano A, Palacin M. The rBAT gene is responsible for L-cystine uptake via the b<sup>0</sup>,(-)-like amino acid transport system in a “renal proximal tubular” cell line (OK cells). *J Biol Chem* 271: 10569–10576, 1996.
- Morales, A., M. A. Barrera, A. B. Araiza, R. T. Zijlstra, H. Bernal and M. Cervantes. 2011. Effect of excess levels of lysine and leucine in wheat-based, amino acid fortified diets on the mRNA expression of two selected cationic amino acid transporters in pigs. *J Anim Physiol a Anim Nutr* 12/2011
- Morales, A., M.A. Barrera, B.A. Araiza, R.T. Zijlstra, H. Bernal, M. Cervantes. 2013. Effect of excess levels of lysine and leucine in wheat-based, amino acid-fortified diets on the mRNA expression of two selected cationic amino acid transporters in pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr* 97:263-270.
- Novelli A, Tasker RAR (2008) Excitatory amino acids in epilepsy: from the clinics to the laboratory. *Amino Acids* 32:295–297

- NRC, 2012. Nutrient Requirements of Pigs, Ninth Revised Edition. National Academy Press, Washington, D.C
- Orlando GF, Wolf G, Engelmann M (2008) Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice. *Amino Acids* 35:17–27
- Oxender DL, Christensen HN. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem* 238: 3686–3699, 1963.
- Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 78: 969–1054, 1998.
- Palacin M, Fernandez E, Chillaron J, Zorzano A. The amino acid transport system b<sub>0</sub>,<sub>+</sub> and cystinuria. *Mol Membr Biol* 18: 21–26, 2001.
- Palacin M. A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic and zwitterionic amino acid transport: a tale of two proteins in search of a transport function. *J Exp Biol* 196: 123–137, 1994.
- Pfeiffer R, Loffing J, Rossier G, Bauch C, Meier C, Eggermann T, Loffing-Cueni D, Kuhn LC, Verrey F. Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol Biol Cell* 10:4135–4147, 1999.
- Pfeiffer R, Rossier G, Spindler B, Meier C, Kuhn L, Verrey F. Amino acid transport of y<sub>+</sub>L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J* 18: 49–57, 1999.
- Pfeiffer, R., Rossier, G., Spindler, B., Meier, C., Kuhn, L. and Verrey, F. (1999) Amino acid transport of y<sub>+</sub>L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.* 18, 49–57
- Phang JM, Donald SP, Pandhare J, Liu Y (2008) The metabolism of proline, as a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino Acids* 35:681–690

- Preston RL, Schaeffer JF, Curran PF. Structure-affinity relationships of substrates for the neutral amino acid transport system in rabbit ileum. *J Gen Physiol* 64: 443–467, 1974.
- Reig N, Chillaron J, Bartoccioni P, Fernandez E, Bendahan A, Zorzano A, Kanner B, Palacin M, Bertran J. The light subunit of system b(o,<sub>+</sub>) is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J* 21: 4906–4914, 2002.
- Rerat, A., Simous-Nunes, C., Mendy, F., Vaissade, P., Vaugelade, P., 1992. Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the nonanaesthetized pig. *Br. J. Nutr.* 68, 111-138
- Romeo E, Dave MH, Bacic D, Ristic Z, Camargo SM, Loffing J, Wagner CA, Verrey F. Luminal kidney and intestine SLC6 amino acid transporters of B0AT-cluster and their tissue distribution in *Mus musculus*. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F376–F383, 2006.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schultz SG, Curran PF. Coupled transport of sodium and organic solutes. *Physiol Rev* 50: 637–718, 1970.
- Segawa H, Miyamoto K, Ogura Y, Haga H, Morita K, Katai K, Tatsumi S, Nii T, Taketani Y, Takeda E. Cloning, functional expression and dietary regulation of the mouse neutral and basic amino acid transporter (NBAT). *Biochem J* 328: 657–664, 1997.
- Siamak A. Adibi and Donald W. Mercer. 1973. Protein Digestion in Human Intestine as Reflected in Luminal, Mucosal, and Plasma Amino Acid Concentrations after Meals *J Clin Invest.* July; 52(7): 1586–1594
- Suenaga R, Tomonaga S, Yamane H et al (2008) Intracerebroventricular injection of L-arginine induces sedative and hypnotic effects under an acute stress in neonatal chicks. *Amino Acids* 35:139–146

- Suryawan A, Davis TA (2011) Regulation of protein synthesis by amino acids in muscle of neonates. *Front Biosci* 16:1445–1460
- Tate SS, Yan N, Udenfriend S. Expression cloning of a Na<sup>(-)</sup>- independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1–5, 1992.
- Terada T, Shimada Y, Pan X, Kishimoto K, Sakurai T, Doi R, Onodera H, Katsura T, Imamura M, Inui K. Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract. *Biochem Pharmacol* 70: 1756–1763, 2005.
- Torras-Llort, M., Torrents, D., Soriano-García, J.F., Gelpí, J.L., Estévez, R., Ferrer, R., Palacín, M., Moretó, M., 2001. Sequential Amino Acid Exchange across b<sub>0</sub>,+ -like System in Chicken Brush Border Jejunum. *J. Memb. Biol.* 180, 213– 222.
- Torrents, D., Estevez, R., Pineda, M., Fernandez, E., Lloberas, J., Shi, Y. B., Zorzano, A. and Palacin, M. (1998) Identification and characterization of a membrane protein (y<sup>+</sup>L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y<sup>+</sup>L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Biol. Chem.* **273**, 32437–32445.
- Trujillo-Coutiño Josué E., José L. Figueroa-Velasco<sup>1</sup>, Manuel Martínez-Aispuro<sup>1</sup>, Vicente Zamora-Zamora<sup>1</sup>, José L. Cordero-Mora<sup>1</sup>, Ma. Teresa Sánchez-Torres<sup>1</sup>, Manuel Cuca-García<sup>1</sup> y Miguel Cervantes-Ramírez. 2007. CONCENTRACIÓN DE UREA EN PLASMA Y RESPUESTA PRODUCTIVA DE CERDOS EN INICIACIÓN ALIMENTADOS CON DIETAS SORGO-PASTA DE SOYA BAJAS EN PROTEÍNA *Agrociencia* 41: 597-607
- Van Winkle LJ, Campione AL, Gorman JM. Na<sup>-</sup>-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J Biol Chem* 263: 3150–3163, 1988.

- Wells RG, Hediger MA. Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5596–5600, 1992.
- Whittemore CT, Green DM, Knap PW. - 2001- Technical review of the energy and protein requirements of growing pigs: protein, *Animal Science*, 73, 363-373
- Willis A, Beander HU, Steel G, Valle D (2008) PRODH variants and risk for schizophrenia. *Amino Acids* 35:673–679
- Wu G, Bazer FW, Cudd TA et al (2007b) Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals. *J Nutr* 137:1673S–1680S
- Wu G, Bazer FW, Davis TA et al (2007a) Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livest Sci* 112:8–22
- Wu G, Collins JK, Perkins-Veazie P et al (2007c) Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr* 137:2680–2685
- Wu G, Knabe DA, Kim SW (2004c) Arginine nutrition in neonatal pigs. *J Nutr* 134:2783S–2790S
- Wu G: Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009, 37:1–17.