

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



TESIS

**CONCENTRACIÓN SÉRICA DE AMINOÁCIDOS Y FACTORES DE
CRECIMIENTO EN CERDOS SUPLEMENTADOS CON AMINOÁCIDOS
LIMITANTES Y LEUCINA**

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

PRESENTA:

KARINA MINERO GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA ABRIL 2011.

“Concentración sérica de aminoácidos y factores de crecimiento en cerdos suplementados con aminoácidos limitantes y leucina”, tesis presentada por Karina Minero García, como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias, ha sido aprobado y aceptado por el comité revisor:

Dra. Adriana Morales Trejo
P R E S I D E N T E

Dr. Miguel Cervantes Ramírez
S E C R E T A R I O

Dr. Jorge Luis Yáñez Hernández
S I N O D A L

Dr. Alfonso Benedicto Araiza Piña
S I N O D A L

M.C. Salvador Espinoza Santana
S I N O D A L

Abril de 2011

Ej. Nuevo León, B.C.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC)

Al Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA)

A mi directora de tesis: **Dra. Adriana Morales Trejo**, por su gran apoyo y motivación para la culminación de la maestría y para la elaboración de esta tesis. Gracias por brindarme su amistad y paciencia.

A mis tutores y asesores: Dr. Miguel Cervantes, Dr. B. Alfonso Araiza, Dr. Jorge Luis Yáñez. Por ayudarme en este proceso de aprendizaje y compartirme sus conocimientos.

A mis compañeros y amigos: Néstor, Vianey, Avelar, Fernando, Héctor, Verónica y Dalila, por compartir esta experiencia conmigo. Gracias por su apoyo.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Convocatoria Ciencia Básica, CONACYT 2006. Proyecto No. 0061299 a cargo de la Dra. Adriana Morales Trejo investigadora del Instituto de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma de Baja California.

DEDICATORIA

A Dios:

Por ser mi guía, por permitirme culminar con este proyecto satisfactoriamente.

A mis padres:

Por su gran amor, comprensión y fortaleza que me han brindado a lo largo de mi vida.

A Dany:

Por ser mi ejemplo, mi motivación, mi pilar... Gracias a ti he podido vivir esta experiencia y gracias a ti he podido crecer personal y profesionalmente.

A Zai y Pedro:

Por su gran amistad, apoyo, comprensión y paciencia. Esta experiencia comenzó como un proyecto profesional, pero cuando los conocí a ustedes, se convirtió en una experiencia de vida. Gracias por estar a mi lado en los momentos más difíciles.

A la Sra. Amalia:

Por su compañía, sus consejos y por brindarme su amistad. Es difícil estar lejos de casa, pero a su lado ha sido mas grata mi estancia, gracias por toda su dedicación.

RESUMEN

Las dietas balanceadas favorecen la adecuada absorción de nutrientes y el crecimiento de los animales, a su vez, el crecimiento es regulado por la liberación y actividad de los factores de crecimiento. La hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I) son los principales factores que promueven la hipertrofia y estimulan la división celular en músculos y huesos, entre otros tejidos. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la adición de aminoácidos limitantes (lisina, treonina y metionina) y leucina a la dieta de cerdos en crecimiento sobre la concentración sérica de aminoácidos, GH e IGF-I. Se emplearon 20 cerdos (Landrace x Hampshire x Duroc), con $14.9 \pm$ kg peso vivo inicial, mismos que fueron distribuidos en cuatro tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento, los tratamientos consistieron en cuatro dietas: T1) dieta base trigo deficiente en lisina, treonina y metionina ; T2) dieta base más lisina, treonina y metionina (LTM); T3) dieta 2 más leucina; T4) dieta testigo trigo-pasta de soya, 1.05% lisina. Al final del experimento de 28 días de alimentación, se obtuvieron muestras de 10 ml de sangre que fue procesada para separar el suero. La concentración de aminoácidos en suero fue analizada por cromatografía. La adición de LTM+Leu incremento la concentración sérica de arginina ($P=0.005$) y leucina ($P=0.040$) en comparación con LTM. Por otra parte se mostraron respuestas altamente significativas con la inclusión de LTM+Leu, en esta dieta, la concentración sérica de isoleucina disminuyo ($P<0.001$) e incremento la concentración de lisina ($P<0.001$) en comparación con la dieta base. Las dietas que incluyeron LTM incrementaron la concentración de lisina ($P<0.001$) y treonina ($P<0.002$) en comparación con la dieta base. La adición de LTM incremento (<0.001) la concentración de lisina en comparación con la dieta testigo y disminuyo ($P=0.004$) la concentración de metionina. En las concentraciones de fenilalanina y valina no se observaron cambios significativos. Mediante la técnica de ELISA se analizó la concentración de GH e IGF-I en suero. La adición de LTM incrementó ($P<0.05$) la concentración sérica de GH e IGF-I. La adición de leucina y la dieta testigo incrementaron ($P<0.001$) la concentración de IGF-I, en comparación con la dieta con LTM. En conclusión, las concentraciones séricas de GH e IGF-I se incrementan al incluir AA limitantes y leucina a la dieta, independientemente de que sean en forma libre o como parte de la proteína.

INDICE

RESUMEN	iv
INDICE	v
LISTA DE ABREVIACIONES	vii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Crecimiento.....	3
2.1.1 Regulación del crecimiento	3
2.1.2 Crecimiento compensatorio.....	4
2.2 Factores de crecimiento.....	4
2.3 Eje GH/IGF-I.....	6
2.3.1 Factores que afectan el eje GH/IGF-I.....	7
2.3.1.1 Edad	7
2.3.1.2 Tratamiento con GH exógena y cantidad de proteína en la dieta	8
2.3.1.3 Nutrición.....	9
2.3.1.4 Ayuno y restricción alimenticia.....	10
2.4 Hormona del Crecimiento (GH).....	10
2.4.1 Estructura.....	10
2.4.2 Secreción	11
2.4.3 Transporte plasmático.....	11
2.4.4 Receptor de GH	12
2.4.5 Mecanismo de Acción	13
2.4.6 Efectos de GH.....	14
2.5 Factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I).....	15
2.5.1 Receptores de IGF-I	15
2.5.2 Transporte plasmático	16
2.5.3 Síntesis y niveles séricos de IGF-I.....	17
2.5.4 Efectos Metabólicos de IGF-I.....	17
2.6 Relación entre el nivel de proteína en la dieta y concentración sérica de los factores de crecimiento	18

3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1 General	20
5.2 Específicos	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Animales.....	21
6.2 Sacrificio y toma de muestras	22
6.3 Análisis de laboratorio.....	22
6.3.1 Extracción de ARN total	22
6.3.2 Transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....	23
6.3.3 Determinación de la concentración sérica de GH e IGF-I	25
6.3.4 Determinación de la concentración sérica aminoácidos	26
6.4 Análisis estadístico	26
7. RESULTADOS	27
7.1 Expresión de factores de crecimiento GH e IGF-I.....	27
7.2 Concentración sérica de aminoácidos	27
7.3 Concentración sérica de factores de crecimiento GH e IGF-I	28
8. DISCUSIÓN	30
8.1 Expresión de factores de crecimiento GH e IGF-I.....	30
8.2 Concentración sérica de aminoácidos.....	30
8.3 Concentración sérica de factores de crecimiento	32
8.3.1 GH	32
8.3.2 IGF.....	34
9. CONCLUSIONES	36
10. LITERATURA CITADA	37

LISTA DE ABREVIACIONES

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ALS	Subunidad del ácido lábil
CC	Crecimiento compensatorio
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
GH	Hormona de crecimiento
GHBP	Proteína transportadora de hormona de crecimiento
GHR	Receptor de hormona de crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
IGF-I	Hormona de crecimiento similar a insulina tipo I
IGFBP	Proteína transportadora del factor de crecimiento similar a insulina
IGFR	Receptor de hormona de crecimiento similar a insulina
IP3K	Fosfatil inositol 3 quinasa
JAK	Janus Activating Kinasa
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
mTOR	Blanco de la Rapamicina en mamíferos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
pGH	Hormona de crecimiento porcina
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
RT	Retrotranscripción
SS	Somatostatina
STAT	Transductor de la señal activadores de la transcripción

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los factores de crecimiento.	5
Cuadro 2. Efectos de la hormona de crecimiento (GH) en el metabolismo de los animales	15
Cuadro 3. Proteínas transportadoras de IGF-I y sus características.....	16
Cuadro 4. Composición de las dietas experimentales.....	21
Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados para PCR punto final	24
Cuadro 6. Efecto de la adición de AA limitantes y la adición de leucina a dietas base trigo en la concentración sérica de AA esenciales en cerdos en crecimiento	28
Cuadro 7. Concentración sérica de hormona de crecimiento (GH) y factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I) de cerdos en crecimiento alimentados con las dietas experimentales.	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las relaciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-tejidos blancos.	7
Figura 2. Señalización de la Hormona de crecimiento	14
Figura 3. Fragmentos de ARN Ribosomal, GH, IGF-I e IGFR amplificados por PCR punto final	27

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento animal es regulado por factores muy diversos, entre los más importantes se han citado la alimentación, y factores hormonales como la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I) (Straus, 1994). Específicamente se ha visto que los dos últimos factores, GH e IGF-I promueven la hipertrofia, el metabolismo de nutrientes y la división celular en sus tejidos blanco (hígado, huesos y tejido muscular, entre otros) (Etherton, 2004). Para iniciar su actividad la GH es secretada en hipófisis y transportada vía sanguínea a todo el organismo. Específicamente en hígado la GH estimula la secreción de IGF-I para amplificar su efecto sobre el crecimiento (Butler y Le Roith, 2001). De esta manera, en tejido muscular GH e IGF-I incrementan la síntesis de proteína e hipertrofia de las fibras musculares; en tejido adiposo inducen la liberación de ácidos grasos y disminuyen la síntesis de lípidos; y además promueven el crecimiento de los huesos, entre otros efectos (Le Roith et al., 2001), siempre que el aporte de nutrientes como energía y proteína al organismo sea balanceado y suficiente (Thissen et al., 1994).

En forma práctica, para optimizar el desempeño productivo de los cerdos, sus dietas balanceadas se diseñan para cubrir sus requerimientos de AA esenciales y limitantes de acuerdo a la composición de las mismas. Sin embargo, estudios recientes muestran que además, los aminoácidos de cadena ramificada, y en especial la leucina, participan en la activación de la síntesis de proteína, mecanismo importante para favorecer el crecimiento a nivel celular (Blomstrand et al., 2006), y que por tanto, pudiera afectar la síntesis de GH e IGF-I, al ser éstos dos factores de origen proteico.

En el presente trabajo se analizó el efecto de adicionar aminoácidos limitantes y leucina a la dieta de cerdos en crecimiento sobre la concentración de aminoácidos y GH e IGF-I en suero.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Crecimiento

Crecimiento, es el incremento del animal en tamaño (peso) producto de la división celular, elongación de las células e incorporación de material desde el medio. El crecimiento en los tejidos de los animales ocurre por dos procesos, la hipertrofia y la hiperplasia (Hafez, 1972).

La hipertrofia se define como el crecimiento del tamaño de la célula principalmente causado por incrementos en proteína y contenido de ARN, mientras que la hiperplasia es el aumento en el número de células, resultado de la proliferación y apoptosis. La hiperplasia y la hipertrofia no se producen de manera simultánea (Lawrence y Flower, 2002).

El crecimiento del tejido muscular y adiposo difiere del crecimiento que experimentan otros órganos del cuerpo. A consecuencia de la edad ambos tejidos crecen por hipertrofia (Hafez, 1972). El crecimiento del tejido muscular ocurre por acumulación de proteínas en las células musculares; mientras que el tejido adiposo crece por acumulación intracelular de lípidos. Por consiguiente, las dimensiones de las células musculares y adiposas varían con la edad y estado nutricional del animal (Hafez, 1972).

2.1.1 Regulación del crecimiento

Durante el crecimiento, las células del organismo pueden dividirse en poblaciones en fase de renovación, de expansión y estática (Hafez, 1972). Los órganos disponen de mecanismos homeostáticos para ajustar la actividad celular a sus necesidades. El crecimiento normal y la división celular requieren de la participación de hormonas tales como la hormona de crecimiento (GH) e insulina. Ambas hormonas

resultan importantes para promover la síntesis de proteína y por consiguiente para la hipertrofia de las células (Hafez, 1972).

2.1.2 Crecimiento compensatorio

El crecimiento compensatorio (CC) es definido como un proceso fisiológico por el cual un organismo acelera su tasa de crecimiento después de un periodo de desarrollo restringido, aumentando la capacidad funcional de órganos y tejidos (Hornick et al., 2000). El CC puede ser el resultado de una reducción en el aporte de alimento o por dietas deficientes en nutrientes (Drouillard et al., 1991), se ha señalado que la respuesta en el CC es mayor cuando ésta sigue a una restricción energética que a una proteica (Drouillard et al., 1991).

El CC tiene efecto directo sobre el crecimiento y metabolismo de los órganos viscerales. Durante la restricción nutricional los tejidos metabólicamente activos como el hígado y tracto digestivo se reducen en tamaño, debido a una disminución en la cantidad de energía o proteína disponible (Kamalzadeh et al., 1998). Una vez que termina la fase de restricción, el consumo se incrementa para cubrir los requerimientos del individuo y el hígado y tracto digestivo se restablecen. En consecuencia ocurre un incremento en la síntesis de proteína, y en la demanda de energía por los tejidos viscerales (Lawrence y Fowler, 2002).

2.2 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular (Ramírez, 2007). La función de los factores de crecimiento no sólo es estimular la proliferación celular iniciando la

mitosis, sino también el mantener la supervivencia celular, estimular la migración y diferenciación, e incluso la apoptosis (Maldonado y Jaramillo, 1996).

Los factores de crecimiento actúan uniéndose a receptores celulares situados en la membrana celular que transmiten la señal del exterior al interior de la célula, mediante el acoplamiento de diferentes proteínas quinasas que se fosforilan y que activan una cascada de señales que acaba con la activación de uno o varios genes, fenómeno conocido como transducción de señales (Maldonado y Jaramillo, 1996). Los diferentes tipos de factores de crecimiento se enlistan en la Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de los factores de crecimiento (Ramírez, 2007).

FACTOR DE CRECIMIENTO	CARACTERÍSTICAS
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Es producido por las plaquetas e induce la multiplicación celular y la regeneración del tejido óseo
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Es una proteína de 53 AA que estimula la mitosis y diferenciación de las células epiteliales y endoteliales
Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	Ejerce sus efectos biológicos a través de su receptor transmembranal (c-Met) con actividad de tirosina quinasa, promueve la reparación del tejido y la regeneración de varios órganos
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis, estimula la división y la migración de células endoteliales, también es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular
Factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I)	La molécula presenta aproximadamente un 50 % de similitud en la secuencia de aminoácidos con la proinsulina, y tiene un número de funciones biológicas similares a las de la insulina
Eritropoyetina (EPO)	Es una hormona glicoproteica que estimula la formación de eritrocitos
Trombopoyetina (TPO)	Es un factor humoral que estimula la producción de trombocitos (plaquetas)

Mediante estudios con cultivos celulares se descubrió que los factores de crecimiento, se producen en diferentes tejidos y son transportados por el suero hacia sus células blanco en donde las respuestas que provocan son muy variables dependiendo del tipo celular (Cadena et al., 1998).

2.3 Eje GH/IGF-I

El crecimiento es regulado por diversos factores hormonales, de los cuales destaca el eje hipotálamo-hipófisis-tejidos blancos (Butler y Le Roith, 2001). La regulación del crecimiento por este eje se explica de la siguiente manera: la hormona de crecimiento (GH) es liberada al torrente sanguíneo por la hipófisis, respondiendo a la hormona liberadora de GH (GHRH) proveniente del hipotálamo y circula por todo el organismo enviando señales a órganos que intervienen en el crecimiento principalmente hígado, donde se sintetiza el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I) (Florini et al. 1996). El IGF-I al igual que GH se secreta y viaja vía sanguínea estimulando el crecimiento de sus células o tejidos blanco (Figura 1). Los principales tejidos blanco de IGF-I y GH son: músculo, hueso, cartílago, nervios e hígado (Cadena, 1998).

En sangre el IGF-I circula ligado a sus proteínas de unión denominadas IGFBP. Las células blanco de GH o IGF-I poseen receptores específicos localizados en sus membranas celulares, éstos les permiten detectar la existencia de ambos factores en sangre y responder a su estímulo (Waters, et al. 2006, Ferry, et al. 1999). Finalmente, concentraciones elevadas del IGF-I en sangre por retroalimentación negativa inhiben la secreción de GH (Florini et al., 1996).

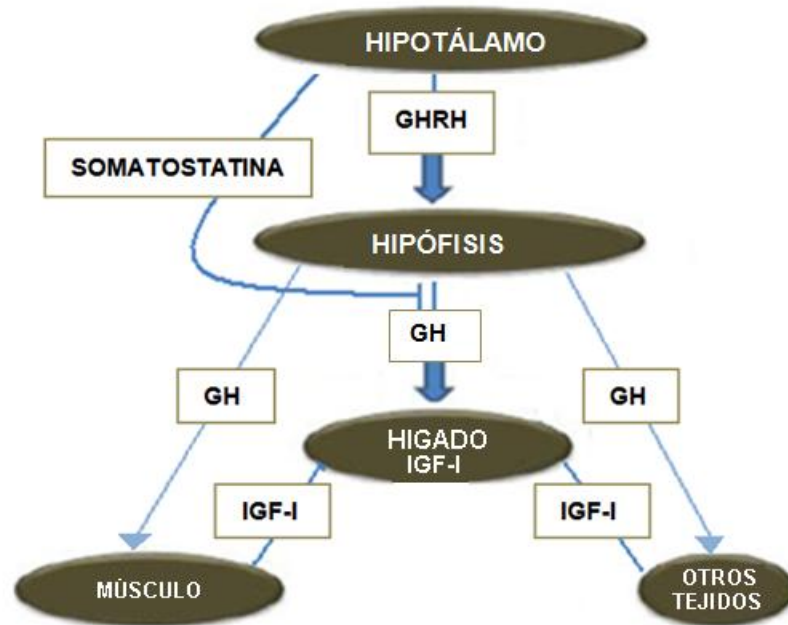


Figura 1. Esquema de las relaciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-tejidos blancos. Las flechas finas indican los efectos estimulatorios, mientras las flechas gruesas indican las inhibiciones, adaptado de Florini (1996).

2.3.1 Factores que afectan el eje GH/IGF-I

La regulación adecuada del eje GH/IGF-I para el crecimiento del organismo es afectada por una serie de factores que finalmente repercute en la velocidad de crecimiento y salud de los animales (Le Roith et al., 2001). A continuación se citan los principales factores que pueden alterar esta vía.

2.3.1.1 Edad

La secreción de GH y la síntesis de IGF-I, disminuyen conforme crece el animal. Después del nacimiento la secreción de GH es alta y decae durante el período neonatal hasta la pubertad (Sherlock y Toogood, 2007). Durante la etapa madura del individuo varios cambios contribuyen al descenso en la producción de ambos factores, como lo

es la composición corporal, el ejercicio, la dieta o las horas de sueño (Sherlock y Toogood, 2007).

Investigaciones realizadas en ratones muestran que la liberación de GH e IGF-I disminuyen una vez que el individuo va alcanzando su edad adulta (Sherlock y Toogood, 2007). Además, se ha observado una correlación entre la disminución de la secreción y vida media de GH con un incremento en el tamaño de los adipocitos y la disminución del desempeño físico (Sherlock y Toogood, 2007). Por otra parte, se demostró que la sobreexpresión de IGF-I induce a una hipertrofia muscular y atenúa la atrofia de fibras envejecidas del músculo restaurando y mejorando la masa y fuerza muscular (Oksbjerg et al., 2004).

2.3.1.2 Tratamiento con GH exógena y cantidad de proteína en la dieta

La administración de hormona de crecimiento porcina (pGH) estimula la síntesis de proteína y reduce la acumulación de grasa, actuando directamente en la inhibición de la lipogénesis (Campbell et al. 1990). Diversos estudios en cerdos han demostrado que la administración de GH incrementa el crecimiento muscular y los niveles de GHR en el hígado (Combes et al. 1997).

La administración de pGH en cerdos mejora su desempeño al estimular la producción de carne magra, y canales con bajo contenido de grasa. Este efecto pudo comprobarse en un trabajo de Campbell et al. (1999), quienes realizaron un experimento suministrando 0.09 mg/kg de pGH vía intramuscular y descubrieron que la tasa de acumulación de proteína fue afectada por la administración de pGH exógena, por el contenido de proteína en la dieta y por interacción entre ambos factores. En ese trabajo se encontró que tras la administración de pGH, los cerdos alimentados con

dietas con alto contenido de proteína presentaron mejor tasa de crecimiento y ganancia diaria de peso; y que no se observó respuesta en cerdos alimentados con dietas bajas en proteína.

2.3.1.3 Nutrición

El estado nutricional es importante en la regulación del eje somatotrópico (GH - IGF-I), puesto que tanto el exceso como la deficiencia de nutrientes influyen de forma diferencial (Buonomo y Baile, 1991). Dentro de las primeras etapas de la vida, el eje somatotrópico parece ser muy sensible a las modificaciones en la alimentación, ya que dependiendo del nivel nutritivo de la dieta se facilita la rápida maduración de este eje respecto a animales con deficiencia en su nutrición (Thissen et al., 1994).

Numerosos estudios han demostrado que la concentración plasmática de IGF-I y la concentración de su proteína transportadora, el IGFBP, se alteran por el estado nutricional del individuo (Buonomo y Baile, 1991). En un estudio realizado por Louveau y Le Dividich (2002) demostraron que la baja ganancia de peso en animales no amamantados se asocia a la disminución en la concentración de IGF-I e IGFBP plasmáticos. Estas observaciones concuerdan con la restricción alimenticia reportada en diferentes especies (Thissen et al., 1994), incluyendo cerdos (Buonomo y Baile, 1991) lo que apoya la relación entre el consumo de energía e IGF-I circulante en cerdos jóvenes (Louveau et al., 2000)

En otra investigación realizada por Sánchez (1999) se observó que la expresión de IGF-I en tejidos extra hepáticos de rata y murino, depende de factores externos y de la disponibilidad de nutrientes. La ingesta de dos dietas isocalóricas con diferente contenido de proteína (20% y 8%) mostró que las dietas de bajo contenido de proteína

disminuyeron la secreción de IGF-I no hepático, mientras que los niveles séricos de GH se incrementaron.

Esto sugiere que el IGF-I producido por tejidos extra hepáticos contribuyen al nivel de IGF-I circulante. Estos resultados demostraron que la nutrición es importante en la regulación de la secreción local de IGF-I, y da fuerza a la hipótesis de que el IGF-I de origen local puede ser un mediador de los efectos promotores de crecimiento (Sánchez, 1999). En otro trabajo, se encontró una correlación entre la reducción de los niveles de IGF-I en la circulación y la disminución en la transcripción de IGF-I en el hígado de ratas desnutridas (Carrasco, 2000).

2.3.1.4 Ayuno y restricción alimenticia

El efecto de la restricción alimenticia en la disminución en las concentraciones de IGF-I se ha reportado en perros (Eigenmann et al., 1985), bovinos (Breier et al., 1988) y borregos (Hodgkinson et al., 1987). Además se ha reportado que los niveles de IGF-I circulante e IGF-BP se reducen durante el ayuno o la restricción de proteína o calorías en la dieta (Buonomo y Baile, 1991), y que la concentración de IGF-I e IGF-II se redujeron en humanos sometidos a ayuno (Marimee et al., 1982). En bovinos, la restricción alimenticia está asociada con la disminución en el número de receptores en el hígado (Breier et al., 1988).

2.4 Hormona del Crecimiento (GH)

2.4.1 Estructura

La GH es un polipéptido de 191 aminoácidos sintetizado y secretado por la hipófisis anterior, presenta una cadena única con dos puentes disulfuro y un peso molecular de 22 kDa (Hossner, 2005).

2.4.2 Secreción

El control de la secreción es bastante complejo y es regulada por la hormona liberadora de GH (GHRH), que tiene un efecto estimulador; por el contrario, la somatostatina (SS) inhibe la secreción de GH (Hossner, 2005). Además, diversos neuropéptidos y neurotransmisores, hormonas y señales metabólicas periféricas interfieren en la dinámica de secreción de GH modulando la liberación hipotalámica de GHRH o de SS; o actúan directamente a nivel hipofisario (Butler y Le Roith, 2001). Otros reguladores de la secreción de GH es el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I) que, en concentración elevada en sangre, inhibe la liberación de GH (Florini, 1996).

El patrón de secreción normal de GH es pulsátil y los intervalos entre los pulsos varían según el sexo y la especie (Butler y Le Roith, 2001). El patrón de secreción es sexualmente dimórfico; los machos exhiben pulsos mayores que las hembras y está influenciado por los andrógenos, éstos regulan la amplitud del pulso, mientras que los estrógenos regulan la secreción basal (Butler y Le Roith, 2001).

2.4.3 Transporte plasmático

Más del 50% de GH viaja ligado a su proteína de unión de alta afinidad (GHBP). La GHBP forma un complejo con la hormona y es la forma soluble y circulante del dominio extracelular del receptor de GH (GHR) (Waters et al. 2006). Los factores que regulan los niveles plasmáticos de GHBP son los estados de desarrollo y nutricional. La GH tiene una vida media en circulación de 15 a 20 minutos luego de su secreción o de una inyección intravenosa (Hossner, 2005). La GHBP prolonga la vida media de GH,

presumiblemente al impedir su filtración glomerular, modular la unión a su receptor específico y como su estabilizador en plasma (Florini et al. 1996).

2.4.4 Receptor de GH

El receptor de la hormona de crecimiento o GHR, es una proteína transmembrana que se une a GH con alta afinidad y es responsable de la respuesta celular a la misma (Butler y Le Roith, 2001). El GHR pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas que comprende receptores con un único dominio transmembrana y necesitan estar asociados por su porción intracitoplasmática, conocida como Box-1, a una proteína con actividad tirosina quinasa, denominada Janus Kinasa (JAK) para que ocurra la transducción de la señal a nivel intracelular (Hossner, 2005). Este receptor está codificado por un único gen, su transcripción y traducción resultan en una proteína de 620 aminoácidos con un peso molecular de 60 kDa aproximadamente (Hossner, 2005). Sin embargo debido a posteriores glicosilaciones y ubiquitinaciones sufridas por la proteína, el peso molecular varía entre 100 y 130 kDa (Waters et. al., 2006).

El GHR presenta una isoforma larga y dos isoformas cortas o truncadas. Estas últimas pierden el 97.5% del dominio intracelular, que incluye regiones esenciales para la transducción de la señal y también la secuencia que regula la internalización del receptor (Hossner, 2005). El GHR ha sido detectado en una gran variedad de tejidos, incluyendo hígado (siendo el tejido que mayormente lo expresa), músculo estriado, riñón, pulmón, glándula mamaria, placenta, tejido adiposo, linfocitos, hueso, cartílago y células del sistema nervioso central (Hossner, 2005).

2.4.5 Mecanismo de Acción

El primer paso en la transducción de señales de GH consiste en la unión de la hormona a su receptor, este evento provoca la dimerización del receptor y activación de las proteínas JAK-2, acopladas a la región Box-1 de cada una de las moléculas del receptor (Hossner, 2005). La proximidad entre las JAKs provoca la fosforilación mutua de residuos tirosina localizadas en el dominio quinasa de las mismas. Una vez fosforilada, JAK 2 ejerce su acción sobre múltiples residuos de tirosina presentes en el GHR, generando sitios de acoplamiento (docking sites) para otras moléculas señalizadoras (Figura 2) (Waters, et. al, 2006). El GHR y JAK-2 activan diversas vías de señalización comunes a varios receptores con actividad tirosina quinasa (Hossner, 2005). Entre las vías activadas podemos citar la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), dos sustratos del receptor insulínico (IRS-1 y 2), la fosfatidil inositol -3 quinasa (IP-3K) y la proteína quinasa C (PKC); todas importantes para los efectos metabólicos y proliferativos de la GH. Estas vías son compartidas por otros receptores con actividad quinasa, además del GHR y los receptores de citoquinas poseen una vía de señalización que utiliza las proteínas citoplasmáticas llamadas STATs (Signal Transducer and Activators of Transcription) (Le Roith et. al, 2001).

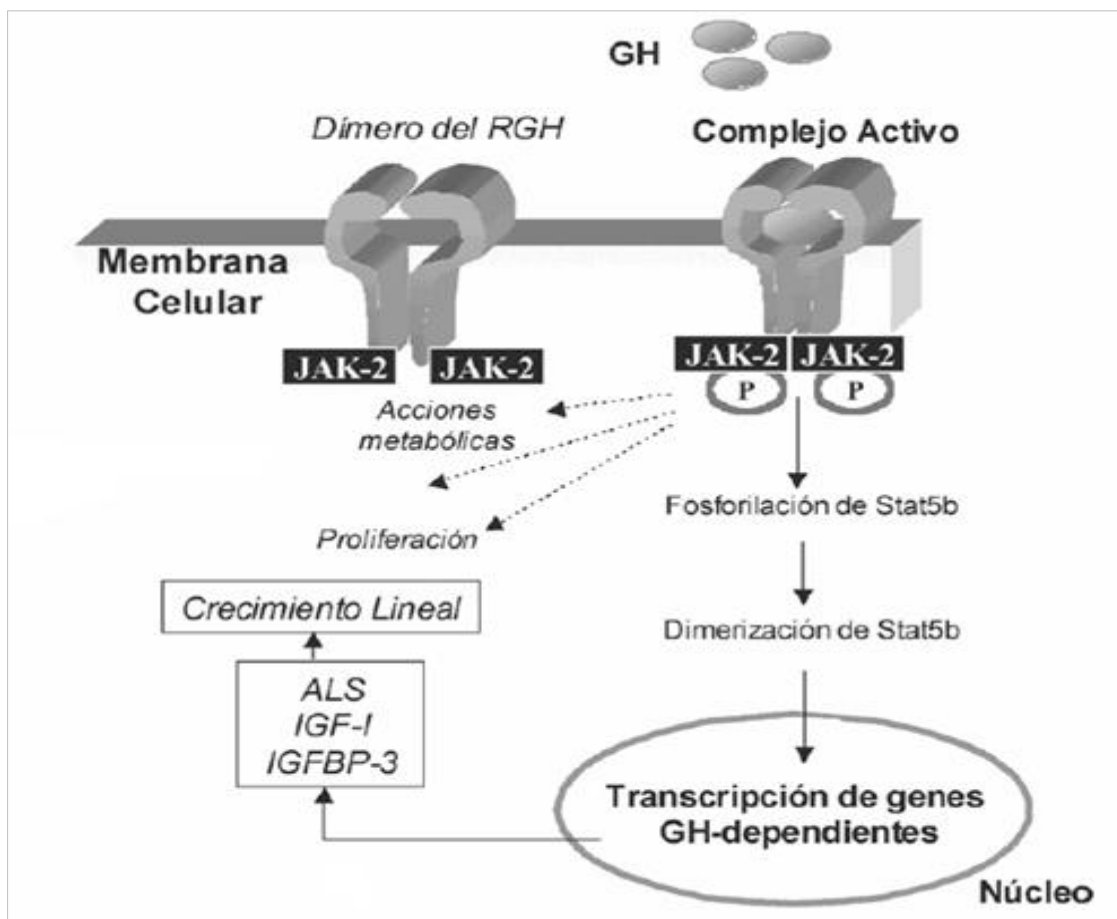


Figura 2. Señalización de la Hormona de crecimiento (Ballerini y Ropelato, 2008).

2.4.6 Efectos de GH

La GH es una hormona anabólica, que afecta a la mayoría de los tejidos. Ejerce su acción directa sobre sus receptores celulares para desencadenar su respuesta y afectar su metabolismo, promover el crecimiento, y estimular la secreción de IGF-I en tejidos como el hígado y músculo, entre otros (Etherton, 2004). Los efectos de GH sobre el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas se enlistan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Efectos de la hormona de crecimiento (GH) en el metabolismo de los animales (Etherton, 2004).

Efectos de GH en el metabolismo	
Carbohidratos	<ul style="list-style-type: none"> •Músculo: Incrementa la captación de glucosa •Tejido adiposo: reduce la captación de glucosa y oxidación de ácidos grasos •Hígado: Incrementa la gluconeogénesis/ glicogenolisis; incrementa la secreción de glucosa (hígado)
Lípidos	<ul style="list-style-type: none"> •Tejido adiposo: reduce la lipogénesis; mejora la lipólisis; e induce la liberación de ácidos grasos
Proteínas	<ul style="list-style-type: none"> •Músculo: Mejora la captación y utilización de AA y la síntesis de Proteína. Favorece el crecimiento muscular •Hígado: reduce la oxidación de AA •Varios tejidos: mejora la eficiencia en la utilización de lisina

2.5 Factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I)

El IGF-I es una proteína monocatenaria de 70 aminoácidos con tres puentes disulfuro intramoleculares, tiene una estructura molecular muy similar a la proinsulina (precursor de la insulina) y su peso molecular es de 7.5 kDa (Hossner, 2005). El IGF-I es un factor de crecimiento que media los efectos de GH y tiene múltiples funciones en el crecimiento y desarrollo animal (Ferry, et. al., 1999). Es una hormona circulante que se produce en la mayoría de los tejidos; actúa de manera autócrina y parácrina; es secretada independientemente de GH; y su homólogo, el IGF-2, regula el crecimiento fetal (Cadena, 1998)

2.5.1 Receptores de IGF-I

El IGF-I se une al menos a tres receptores de la membrana celular: el receptor de IGF-I, el receptor de IGF-II y el receptor de insulina (Hossner, 2005). Estos receptores son tirosina-quinazas (fosforilan partículas de tirosina). El receptor de IGF-I presenta

alta afinidad por el IGF-I, baja por el IGF-II y muy baja por la insulina (Ferry et. al., 1999). La afinidad de IGF-II por el receptor IGF-I es baja. Los receptores de insulina y de IGF-I son muy similares en sus estructuras y secuencia de aminoácidos (30% similares) por lo que el receptor de la insulina también posee la capacidad de unir a IGF-I, aunque su afinidad es 10 veces menor a la de insulina (Le Roith, et. al. 2001).

2.5.2 Transporte plasmático

El 98 a 99% del IGF-I viaja en sangre unido a las proteínas transportadoras del factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP) (Hossner, 2005), el resto viaja libre con una vida media de unos 20 minutos (Ferry et al. 1999). Existen 6 proteínas transportadoras de IGF-I (Cuadro 3), de las cuales IGFBP-3 es la más abundante (transporta aproximadamente el 80% del IGF-I) y además de estar unida a IGF-I se une a un péptido o subunidad ácido lábil (ALS) y forma una estructura compleja, logrando que dicho factor prolongue su vida media de 10 minutos, a 10 ó 12 hrs (Ferry et al. 1999).

Cuadro 3. Proteínas transportadoras de IGF-I y sus características.

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS
IGFBP-1	En altas concentraciones en líquido amniótico; secretada por hepatocitos. Regulada por la insulina, AMPc y otros factores.
IGFBP-2	Presente en suero, líquido cefalorraquídeo y semen; secretada por diferentes tipos de células; mayor expresión en tejido fetal que en tejido adulto.
IGFBP-3	Proteína de mayor fijación de IGF-I en suero; secretada por hepatocitos y otras células; sus niveles séricos son independientes de GH.
IGFBP-4	Su ARNm está presente en muchos tejidos, más abundante en el hígado; inhibe la acción de IGF-I en muchos tipos de células.
IGFBP-5	Su ARNm es más abundante en riñón; los niveles en suero son más bajos y están asociados a la matriz extracelular.
IGFBP-6	Presente en suero y líquido cefalorraquídeo; su ARNm abundante en diferentes tejidos y sus niveles séricos son dependientes de GH.

Las concentraciones plasmáticas y tisulares de las IGFBPs, están reguladas por varios factores como la GH, la insulina, los agentes quelantes y las proteasas séricas y tisulares (Jaramillo y Maldonado, 1996).

2.5.3 Síntesis y niveles séricos de IGF-I

La GH es el principal estímulo para la síntesis hepática de IGF-I, órgano en donde se produce el 90% del IGF-I circulante. Cuando GH llega al hígado, interactúa con sus receptores específicos y estimula la expresión del gen que codifica a IGF-I (Cadena et. al., 1998). Recientemente se ha encontrado que el IGF-I puede ser producido en una gran variedad de tejidos, lo que sugiere la posibilidad de que no solamente actúe como una hormona endocrina sino también como una hormona autócrina y parácrina (Cadena et. al., 1998). Altos niveles séricos de IGF-I actúan en retroalimentación negativa en el hipotálamo, induciendo a la secreción de somatomedina (SS) y reduciendo la secreción de GH (Hossner, 2005).

2.5.4 Efectos Metabólicos de IGF-I

Los primeros efectos de IGF-I son activar la mitosis y diferenciación celular (Jaramillo, 1996). En adición IGF-I incrementa la captación de aminoácidos, inhibe la degradación de proteína y estimula la síntesis de proteína en muchos tejidos (Etherton, 2004). Esta molécula aumenta la captación de glucosa por los tejidos, ejerciendo un efecto hipoglicemiante que es más potente que el de la insulina y a su vez, favorece la síntesis de glucogéno hepático (Etherton, 2004). Con relación a los lípidos disminuye la lipólisis, permitiendo la acumulación de los ácidos grasos y triglicéridos en el tejido adiposo. En el cartílago, IGF-I incrementa el colágeno y la síntesis de proteoglicanos (Florini, 1996).

2.6 Relación entre el nivel de proteína en la dieta y concentración sérica de los factores de crecimiento

Es bien conocido que GH mejora la eficiencia de utilización de la proteína de la dieta; y en consecuencia, es probable que el estado nutricional también pudiera afectar directamente la liberación y actividad de esta hormona, aunque no se ha establecido el nivel de nutrición requerido para desencadenar un efecto óptimo sobre el eje somatotrópico (Weller et al., 1994). En este sentido, se ha demostrado que tras la administración de GH exógena en cerdos, cuando incrementa el contenido de proteína en la dieta del 10% al 18%, se ha observado un incremento en la síntesis y almacenamiento de proteína corporal de hasta 90% (Campbell et al., 1990).

Se ha estudiado la concentración de factores de crecimiento en respuesta a períodos largos de restricción alimenticia, y se ha observado que durante la fase de realimentación, la secreción de insulina se incrementa en forma aguda y las concentraciones de GH en el plasma permanecen altas (Whang et al., 2003). Esta situación permite probablemente que más nutrientes sean usados para el proceso de crecimiento. El incremento en la disponibilidad de nutrientes en el hígado da lugar a un incremento en el número de receptores de GH y consecuentemente a la producción de IGF-I (Hornick et al., 2000).

Harel et al., (1993), mencionaron que en animales sometidos a una mala nutrición proteica, se observa una disminución de la liberación espontánea del contenido hipofisario y de la concentración plasmática de GH, aunque se mantiene constante el nivel del receptor de la hormona en hígado.

3. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda por incrementar la eficiencia productiva en los animales, se ha centrado principalmente en el estudio del metabolismo de nutrientes y fisiología digestiva. En contraste hay limitada información acerca de la regulación hormonal que ejerce en los procesos metabólicos, principalmente en el crecimiento animal. Se conoce que el crecimiento está regulado por la actividad de GH e IGF-I y por otros factores, siendo el más importante la nutrición. Los estudios que se han realizado con respecto a la relación que existe entre el factor hormonal y nutricional, se han basado principalmente en roedores y estos estudios se han realizado *in vitro* (Louveau y Le Dividich, 2002), estas condiciones pueden ser diferentes a las observadas *in vivo*. Con respecto a la calidad y cantidad de proteína, existen informes que muestran diferencias marcadas en la velocidad de crecimiento de cerdos alimentados con dietas formuladas con diferente nivel de proteína y aminoácidos (Guay y Trottier, 2006). Además, estudios recientes muestran que los aminoácidos de cadena ramificada, y en especial la leucina, forman parte de los mecanismos de activación de la síntesis de proteína a nivel celular (Blomstrand et al., 2006), lo cual podría estimular la síntesis de GH e IGF-I.

Debido a que no se tiene bien definida la relación de los factores de crecimiento y la concentración sérica de aminoácidos, una vez establecida, podrán ser utilizados a nivel hormonal o nutricional, para mejorar la eficiencia productiva del animal.

4. HIPÓTESIS

Los cerdos alimentados con dietas base trigo suplementados con aminoácidos limitantes, con y sin leucina, presentan diferentes niveles de aminoácidos en sangre, esto afecta la concentración sérica de los factores de crecimiento GH e IGF-I.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar el efecto de la adición de aminoácidos limitantes y leucina en una dieta base trigo proporcionada a cerdos en crecimiento sobre la concentración sanguínea de aminoácidos esenciales y los factores de crecimiento GH e IGF-I.

5.2 Específicos

5.2.1 Determinar la expresión de GH en hipófisis, IGF-I e IGFR en hígado y músculo.

5.2.2 Analizar la concentración de aminoácidos esenciales en suero de los cerdos que fueron alimentados con dietas base trigo suplementadas con aminoácidos limitantes y leucina.

5.2.3 Analizar la concentración sérica de los factores de crecimiento GH e IGF-I de los cerdos que fueron alimentados con dietas base trigo suplementadas con aminoácidos limitantes y leucina.

5.2.4 Relacionar la concentración de aminoácidos en sangre con la concentración sérica de los factores de crecimiento GH e IGF-I.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Fisiología y Metabolismo y en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC.

6.1 Animales

Se emplearon muestras tomadas de 20 cerdos cruzados (Landrace x Hampshire x Duroc), que durante su etapa de crecimiento (PV inicial de 14.9 ± 0.27 kg), fueron alimentados 28 días con cuatro dietas distintas que consistieron en los siguientes tratamientos (T): T1, dieta base trigo; T2, dieta base más 0.88 % lisina, 0.27 % treonina y 0.10 % metionina (LMT); T3, como en T2 más 0.80 % leucina (LMT+Leu); T4, dieta testigo trigo-pasta de soya, 1.05% lisina. Las dietas del T2 y T3 se adicionaron con lisina, treonina y metionina cristalina para igualar su contenido con la dieta testigo (cuadro 4).

Cuadro 4. Composición de las dietas experimentales.

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

Al final de los 21 días de alimentación se observó que la adición de LMT a la dieta base incrementó ($P < 0.001$) la GDP, CDA y CA; y que la inclusión adicional de leucina redujo la GDP y CDA ($P < 0.01$), pero no afectó la CA ($P > 0.10$); además la GDP tendió a ser mayor ($P = 0.09$) en los cerdos con la dieta con LMT que en los testigo, pero no hubo diferencias en CDA o CA (García, 2011).

6.2 Sacrificio y toma de muestras

Los animales del experimento descrito fueron sacrificados a los 28 días de alimentación y al momento del sacrificio se colectaron 4 ml de sangre de cada uno de ellos. Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, para separar el suero y se almacenaron a -20 °C para sus análisis posteriores. Además, inmediatamente posterior a sacrificio se recolectó la hipófisis completa y se tomaron muestras de aproximadamente 0.5 g de hígado, músculo largo dorsal y músculo semitendinoso. Todas las muestras de tejido se colocaron en tubos de 2 ml previamente identificados, se depositaron en nitrógeno líquido y en seguida se almacenaron a -85 °C.

6.3 Análisis de laboratorio

6.3.1 Extracción de ARN total

Para corroborar la expresión y síntesis de los factores de crecimiento GH en hipófisis e IGF-I en hígado y músculos, se verificó la expresión de sus ARN mensajeros en esos tejidos. La extracción de ARN en las muestras de tejido se realizó mediante la técnica descrita para emplearse con Trizol Reagent (Invitrogen, USA; Chomczynski y Sacchi, 1987), con ciertas modificaciones. Se pulverizó el tejido a procesar en nitrógeno líquido. En un microtubo de 2.0 ml se colocó 0.1 g de muestra pulverizada, se agregó

1ml de Trizol se homogenizó y centrifugó a 4°C, durante 10 minutos a 10000 rpm. Después se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se añadió 0.2 ml de cloroformo, se mezcló y se dejó reposar por 2-3 minutos. Inmediatamente se centrifugó a 10, 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, la fase superior fue transferida a un tubo estéril añadiendo 0.5 ml de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, enseguida se centrifugó a 10, 000 rpm a 4°C. Se removió el sobrenadante para recuperar la pastilla y se le agregó 1 ml de etanol al 100%. Después se centrifugó a 8, 500 rpm a 4 °C, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de ARN. La pastilla fue resuspendida con 35 µl de agua estéril tratada con DEPC, por último se corrió un gel de agarosa al 1.2 % para verificar la integridad del ARN. Todas las alícuotas fueron almacenadas a –85 °C, hasta que se procedió a la retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa de cada muestra para verificar la expresión de las proteínas en cuestión.

6.3.2 Transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En un microtubo de 0.5 ml se colocaron los siguientes reactivos: 5 µl de ARN, 6 µl de buffer 5x, 0.75 µl de DNAsa de 0.1 U/ ml (Invitrogen), 18.25 µl de agua tratada con DEPC (agua libre de DNAsa/RNAsa), la reacción se incubó a temperatura ambiente 15 min y después 5 min a 70 °C, se agregó a la reacción 1 µl de random primer 0.15 mg/ml (Invitrogen), 1 µl de DNTP's, se incubó a temperatura ambiente 5 min, después se colocó en hielo mientras se añadió 2 µl de buffer 5x, 3 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de inhibidor de RNAsa 10 U/ ml, se homogenizó y centrifugó (10 seg). A continuación la reacción, se incubó a 42 °C 2 min, se añadió la enzima transcriptasa reversa 200 U/ml (RT-Superscript III, Invitrogen) y se procedió a incubar a 42 °C por 50 min y a 70°

durante 15 min, al finalizar la reacción el ADNc fue almacenado a -85 °C para continuar con la reacción de PCR.

En cada una de las reacciones de PCR se emplearon oligonucleótidos Específicos para GH, IGF-I, IGFR y ARN ribosomal 18S de cerdo, éste último empleado como testigo para cada reacción. Las reacciones de PCR con volumen final de 50 µl se prepararon en microtubos de 0.2 ml, de la siguiente manera: 1 µl de MgCl (50 µM); 1 µl DNTP's (10 µM) ; 5 µl buffer 5X para PCR, 1µl de oligonucleótido antisentido y 1 µl de oligo sentido (10 µM), 0.5 µl de enzima ADN polimerasa (5 U/ul), 3 µl de cADN y 37.5 de agua tratada con DEPC. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Eppendorf, Master cycler gradient, modelo 5331), con el programa siguiente: las temperaturas de amplificación empleadas fueron de 56 a 58 °C, dependiendo de la temperatura de desnaturalización (TM) de los oligonucleótidos específicos para cada fragmento amplificado. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas con 41 ciclos de amplificación. Una vez terminada la amplificación, se verificó el producto de PCR mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % con 5 µl de producto de PCR.

Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados para PCR punto final.

ARN mensajero	Secuencia de nucleótidos	Fragmento amplificado
GH	Sentido: ATGCCCTTGTCAGCCTATT Antisentido: CTGTTGGTGAAGACCCTGCT	286 pb
IGF-I	Sentido: TGCCACGGCTGGACCTGAGA Antisentido: TTGGGCATGTCCGTGTGGCG	258 pb
IGFR	Sentido: TTCTGCTCAGATGCTCCAAG Antisentido: TTATGTCCCCTTTGCTCTGG	397 pb
ARN Ribosomal	Sentido: GGCCTCACTAAACCATCCAA Antisentido: TAGAGGGACAAGTGGCGTTC	295 pb

6.3.3 Determinación de la concentración sérica de GH e IGF-I

Mediante inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA) se analizó la concentración sérica de los factores de crecimiento GH e IGF-I empleando los reactivos y protocolos de RayBiotech, Inc (Cat #: ELH-GH / IGF1-001). El protocolo general para los análisis de ELISA fue el siguiente: se emplearon 100 μ l de cada estándar de proteína (GH e IGF-I) y muestras de suero que fueron colocadas en los pocillos de la placa de ELISA correspondiente, previamente identificadas. Las muestras de suero en las placas se incubaron por 2.5 hrs a temperatura ambiente con agitación suave, al final se decantó la solución y se lavó 4 veces con solución de lavado 1x. Los pocillos se lavaron por llenado con solución de lavado 1x (300 ml) con una pipeta multicanal. Después del último lavado, se eliminó cualquier resto de buffer por decantación. Se añadió 100 μ l de solución de detección de anticuerpos biotinilados 1x a cada pocillo. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave, al final de ese tiempo se decantó la solución. Se repitió el lavado anterior y al final se añadieron 100 μ l de solución preparada de estreptavidina a cada pocillo. Se incubó durante 45 min a temperatura ambiente con agitación suave y se volvió a lavar la placa tal y como se describió antes. Se añadieron 100 μ l de sustrato TMB One Step a cada pocillo y se Incubó durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave. Al final se añadieron a cada pocillo 50 μ l de solución para detener la reacción e inmediatamente se leyó la concentración de cada factor en un lector de placas de ELISA (Multiskan ex, 355, Thermo Electron Corporation) a 450 nm.

6.3.4 Determinación de la concentración sérica de aminoácidos

La concentración de aminoácidos en suero fue determinada de acuerdo a la técnica descrita por Sundae et al. (2003). Las muestras de suero sanguíneo obtenido tras la centrifugación de las muestras sanguíneas fue desproteinizado mediante centrifugación a 5,000 x g, a 4°C, durante 30 min con un filtro Ultrafree-MC 10,000 NMWL Filter Unit (Millipore, Bedford, MA, USA). El producto de la filtración fue derivatizado con el reactivo Waters AccQÆTag. Finalmente los análisis de concentración de aminoácidos se llevaron a cabo por cromatografía en un HPLC (método 982.30E; AOAC, 2006).

6.4 Análisis estadístico

Para analizar los datos del experimento de concentración sérica de factores de crecimiento y aminoácidos, se utilizó un diseño de bloques completos al azar (Steel y Torrie, 1988) utilizando el procedimiento lineal general del SAS (SAS institute, 2000). El análisis de las medias fue con contrastes ortogonales.

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

Donde:

Y_{ij} = Variable dependiente.

μ = Media poblacional.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento.

β_j = Efecto del j-ésimo bloque.

ϵ_{ij} = Error experimental.

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

7. RESULTADOS

7.1 Expresión de factores de crecimiento GH e IGF-I

Para corroborar la expresión de los factores de crecimiento se verificó la expresión de sus ARN mensajeros en los principales tejidos en donde son sintetizados, esta prueba se realizó mediante PCR punto final. La hormona de crecimiento, GH, estuvo expresada en la hipófisis de todos los cerdos que participaron en este estudio. Además se demostró la expresión del factor de crecimiento similar a insulina tipo I, IGF-I, y de su receptor, IGFR en el hígado, y los músculos largo dorsal y semitendinoso de todos los animales. El ARN ribosomal se utilizó como testigo. En la figura 3 se muestran algunas fotografías de los fragmentos de GH, IGF-I e IGFR y ARN Ribosomal, amplificados por PCR punto final.

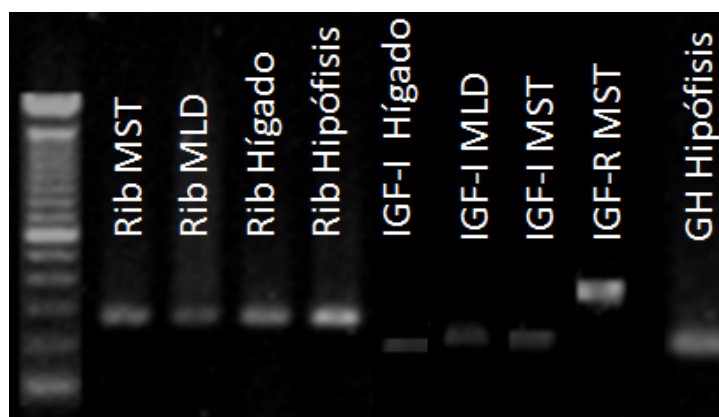


Figura 3. Fragmentos de ARN Ribosomal, GH, IGF-I e IGFR amplificados por PCR punto final.

7.2 Concentración sérica de aminoácidos

Los resultados del análisis de concentración de aminoácidos en suero se muestran en el cuadro 6. La adición de LTM+Leu incrementó la concentración sérica de arginina ($P=0.005$) y leucina ($P=0.040$) en comparación con LTM. Por otra parte se mostraron respuestas altamente significativas con la inclusión de LTM+Leu en la dieta, la concentración sérica de isoleucina disminuyó ($P<0.001$) en comparación con la dieta

testigo, y se incrementó la concentración de lisina en comparación con las dieta base (P<0.001) y testigo (P<0.001). Las dietas que incluyeron LTM incrementaron la concentración de lisina (P<0.001) y treonina (P<0.002) en comparación con la dieta base. La adición de LTM incrementó (P<0.001) la concentración de lisina en comparación con la dieta testigo y disminuyó (P=0.004) la concentración de metionina. En las concentraciones de fenilalanina y valina no se observaron cambios significativos.

Cuadro 6. Efecto de la adición de AA limitantes y la adición de leucina a dietas base trigo en la concentración sérica ($\mu\text{Mol/ml}$) de AA esenciales en cerdos en crecimiento.

Aminoácidos esenciales	Dietas				SE	Contrastes ^a			
	Base	LTM	LTM +Leu	Testigo		C1	C2	C3	C4
Arginina	0.081	0.096	0.161	0.131	0.014	0.442	0.005	0.089	0.143
Isoleucina	0.028	0.044	0.011	0.095	0.009	0.234	0.022	0.002	<0.001
Leucina	0.041	0.061	0.111	0.108	0.016	0.397	0.040	0.050	0.893
Lisina	0.009	0.213	0.179	0.056	0.020	<0.001	0.259	<0.001	<0.001
Metionina	0.025	0.038	0.042	0.075	0.007	0.267	0.660	0.004	0.010
Fenilalanina	0.031	0.047	0.053	0.064	0.008	0.170	0.609	0.147	0.325
Treonina	0.071	0.256	0.267	0.119	0.034	0.002	0.812	0.016	0.010
Valina	0.068	0.083	0.085	0.196	0.028	0.716	0.956	0.015	0.016

^a Contrastes: C₁, Base vs. LTM; C₂, LTM vs LTM+Leu; C₃, LTM vs Testigo; C₄, LTM+ Leu vs Testigo.

7.3 Concentración sérica de factores de crecimiento GH e IGF-I

Los resultados de concentración de GH e IGF-I en suero se muestran en el cuadro 7. La inclusión de leucina en forma libre a la dieta con aminoácidos limitantes (LMT) se asoció con un incremento (P=0.003) en la concentración de GH a nivel sanguíneo, aunque no se observó el mismo efecto en la dieta testigo, donde tanto leucina como los demás aminoácidos estaban presentes en la proteína de la soya.

La concentración sérica de IGF se incrementó de forma significativa (P=0.040) cuando se adicionaron los aminoácidos limitantes (LMT) a la dieta base. También se

observó un incremento en la concentración de IGF-I por efecto de la adición de leucina a la dieta LMT (P=0.002) y por su inclusión como parte de la proteína de la pasta de soya en la dieta testigo (P<0.001).

Cuadro 7. Concentración sérica de hormona de crecimiento (GH) y factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I) de cerdos en crecimiento alimentados con las dietas experimentales.

Variable	Dietas				EE
	Base	LTM	LTM+Leu	Testigo	
GH ¹	14.8	12.6	18.0	13.0	2.78
IGF ²	17.9	20.0	22.6	22.1	1.22

¹ Base vs. LTM: P=0.166; LTM vs. LTM+Leu: P=0.003; LTM vs. Testigo: P=0.114

² Base vs. LTM: P=0.040; LTM vs. LTM+Leu: P=0.002; LTM vs. Testigo: P=0.0006

8. DISCUSIÓN

8.1 Expresión de factores de crecimiento GH e IGF

Se observó la expresión de GH en hipófisis, de IGF-I y su receptor (IGFR) en hígado, y músculos largo dorsal y semitendinoso de todos los animales. La expresión de ARNm de IGF-I en cerdos en crecimiento depende de la edad y, por ejemplo, en hígado se incrementa a partir de los 20 días de edad; aunque la expresión de IGF-I en el músculo largo dorsal es variable (Brameld et al., 1996). Además, la expresión del receptor de GH en el hígado incrementa gradualmente a partir de los 140 días de edad (Brameld et al., 1996). En el estudio llevado a cabo por Brameld et al. (1996) encontraron que la administración de hormona de crecimiento porcina (pGH) (50 µg/kg) en cerdos, provoca un incremento la expresión de IGF-I en hígado y músculo semitendinoso; y además también se observó un incremento en la expresión del receptor de GH en hígado, músculos y tejido adiposo cuando los animales fueron tratados con pGH y alimentados con dietas con un alto contenido de PC.

8.2 Concentración sérica de aminoácidos

Debido a la adición de aminoácidos y proteína en las dietas experimentales, se observó un incremento en la concentración sérica de lisina, treonina y leucina en los animales que consumieron la dieta LTM, LTM+Leu y testigo con respecto a la dieta base. Guay y Trottier (2006) realizaron un experimento con cerdos en crecimiento para determinar el efecto de adicionar aminoácidos cristalinos (AAC) en la dieta de cerdos que fueron asignados a 4 tratamientos con diferentes porcentajes de PC (16.1, 12.8, 10.1 y 7.8 % PC). En ese estudio observaron que al adicionar AAC, la concentración sérica de lisina y treonina disminuyeron en las dietas con 12.8 y 10.1 % de PC, pero en la dieta con 7.8 % de PC los niveles de éstos y otros AA en suero se incrementaron

probablemente debido a la baja utilización y al desbalance de AA alcanzado en esa dieta. Por el contrario, los resultados del presente trabajo muestran un incremento en la concentración de los AA mencionados, reflejo de su adición y rápida absorción por la mucosa intestinal en forma de AA libres.

En cerdos alimentados con la dieta LTM+Leu se observó una disminución en la concentración sérica de lisina y un incremento en leucina, en comparación con los animales que consumieron la dieta solo con LTM, estos resultados concuerdan con estudios realizados por Méndez (2010) y García (2011), que mostraron que al adicionar leucina a dietas base trigo, se reducía la concentración sérica de lisina y la expresión de $b^{0,+}$, un transportador de AA que intercambia lisina intracelular por leucina extracelular en la membrana luminal del intestino delgado. Broer (2008) menciona que la absorción de lisina en células epiteliales es fuertemente estimulada por leucina, por tanto la proporción de lisina:leucina se vuelve crítica cuando hay una reducción en el contenido proteico y por la suplementación con AA libres. Además es probable que el incremento en la concentración de leucina sea consecuencia de su adición en la dieta LTM+Leu.

Los cerdos que consumieron la dieta con LMT+Leu presentaron los niveles más bajos de isoleucina en suero. Es probable que esto sea resultado de que al igual que leucina y valina, isoleucina es un aminoácido de cadena ramificada; éstos tres aminoácidos comparten el mismo transportador en la membrana intestinal y por tanto pudieron haber competido por su ingreso a la célula, quedando isoleucina en desventaja ante un incremento en el consumo de leucina (Liu et al., 2006). Sin embargo, al parecer la absorción de valina no fue afectada en animales que

consumieron las dietas con aminoácidos libres, aunque se incrementó cuando la consumieron como parte de la proteína en la dieta testigo.

Los niveles séricos de arginina aumentaron al adicionar leucina a la dieta, Méndez (2010) encontró que la expresión del transportador CAT1 en yeyuno se afectó de manera diferenciada, debido a que la suplementación de leucina incrementó la expresión de ese transportador. CAT1 es parte del sistema de transporte y^+ , principal vía de entrada de aminoácidos catiónicos (lisina, arginina) en células endoteliales, al haber un incremento de este transportador, la arginina esta mas disponible para el animal, reflejándose en un incremento sérico. Por otra parte, Guay y Trottier (2006) observaron, que en dietas que contenían PC en proporciones adecuadas aumentaba la concentración plasmática de arginina, debido a que este AA puede ser sintetizado a partir de glutamina, ácido glutámico y prolina (Wu, 1997), por lo que la síntesis endógena provee más del 50 % del requerimiento diario de arginina cuando las dietas están formuladas con un adecuado nivel de PC en la dieta.

8.3 Concentración sérica de factores de crecimiento

8.3.1 GH

La inclusión de leucina y aminoácidos limitantes (lisina, metionina y treonina) en forma libre a la dieta, incrementó la concentración de GH. Se conoce que tanto la insulina como los aminoácidos promueven la síntesis de proteína (Wilson et al., 2008) y se ha comprobado que los AA de cadena ramificada, especialmente leucina, así como GH e IGF, incrementan la actividad del complejo mTOR, iniciando la síntesis de proteína (Yang et al., 2007). Bush et al. (2003) demostraron que la infusión de leucina y la administración de GH, en cerdos en crecimiento, incrementan la síntesis de proteína hepática mejorando la eficiencia y capacidad vía mTOR, pero no observaron cambios

en animales que solamente se les administró GH, estos resultados indican que la respuesta a la síntesis de proteína inducida por GH dependen además de otros factores como el estado nutricional y balance de AA en suero (Bush et al., 2003).

Los niveles de GH y arginina en sangre fueron mayores en animales que consumieron dietas con LTM+Leu, en comparación con la dieta base. Esto es similar a lo observado por Merimee (1969), quien demostró que la infusión intravenosa de 183 mg de arginina incrementaba las concentraciones de GH en mujeres. Barbosa et al. (2008) realizaron un estudio con ratas tratadas con 35 mg/d de arginina, y encontraron que la administración de este aminoácido incrementa la expresión de GH, al inhibir la liberación de somatostatina, e incrementar los niveles de cAMP, activación de PKA y fosforilación de factores de transcripción en hipófisis, mismos que estimulan la transcripción y síntesis de GH.

Se ha demostrado que la administración exógena de varios aminoácidos estimulan la liberación inmediata de GH y hormonas pancreáticas en varias especies (Sticker, 2001). La infusión intravenosa de aminoácidos como arginina, histidina, fenilalanina y lisina aumentaron los niveles de GH e insulina. La infusión de valina, treonina y metionina tuvieron un menor efecto en la secreción de GH (Knopf et al. 1965). Por lo tanto, es probable que los animales que consumieron las dietas adicionadas con LTM+Leu, incrementaron su nivel de GH en sangre, al quedar cubiertos los requerimientos de AA con las dietas consumidas. Katsumata et al. (2002), mencionaron que las dietas con niveles adecuados de aminoácidos, son importantes para mantener la normalidad de los niveles circulantes de plasma GH e IGF-I y para un crecimiento óptimo de los animales.

8.3.2 IGF

La concentración sanguínea de IGF se incrementó con las dietas ricas en aminoácidos, ya fueran éstos de forma libre o bien, como parte de la proteína de la pasta de soya. Bajo condiciones fisiológicas normales, GH es el principal regulador de la síntesis y secreción de IGF-I (Buonomo y Baile, 1991); sin embargo, el estado nutricional del individuo también es importante para regular la secreción y concentración de IGF-I; el ayuno o la alimentación con dietas deficientes en energía o proteína está asociado con la reducción en la concentración plasmática de IGF-I (Louveau and Le Dividich, 2002). Este efecto ha sido observado en yeguas que fueron sometidas a restricción proteica y que en consecuencia presentaron una reducción en su concentración de IGF-I en plasma (Sticker et al., 1995).

Recientemente, en un estudio realizado por Guay y Trottier (2006) en cerdos en crecimiento, observaron que la reducción en el contenido de proteína de la dieta provoca una disminución en las concentraciones séricas de IGF-I. Katsumata (2002), realizó una investigación en cerdos alimentados con diferente contenido de lisina y encontró que los animales que habían consumido dietas deficientes en ese aminoácido presentaban niveles disminuidos de IGF-I e IGFBP3 en sangre. El mismo resultado se observó en este trabajo, en que los animales alimentados con la dieta base presentaron baja concentración de lisina y treonina en sangre, y además bajos niveles de IGF-I.

Algunos estudios han demostrado que la disminución de IGF-I circulante durante la restricción proteica está asociada con la reducción de las proteínas de unión de GH (GHBP) o sus receptores en el hígado en cerdos (Buonomo y Baile, 1991). En bovinos y borregos se ha observado la misma respuesta en períodos de restricción alimenticia (Breier, 1988). En ratas alimentadas con dietas ya sea libre de proteína o bajas en el

contenido de proteína cruda, se ha observado una reducción en la ganancia de peso, en la expresión y niveles plasmáticos de IGF-I (Miura et al. 1992). Es probable que si la expresión de GHBP depende de la calidad de la dieta, esto explicaría por qué en el caso de este trabajo se observó el menor nivel de IGF en suero de animales que consumieron la dieta base. Además, estudios en vivo han demostrado que otros factores como la alimentación (Davis et al., 2000), insulina (O'Connor et al., 2003) y suplementación con aminoácidos como leucina (Anthony et al., 2000) inducen cambios en la activación de la traducción y síntesis de proteínas, lo que puede incrementar la secreción de IGF (Blomstrand et al., 2006; Suryawan et al., 2008).

9. CONCLUSIONES

En cerdos en crecimiento alimentados con dietas base trigo, la adición de los primeros aminoácidos limitantes (lisina, metionina y treonina) y leucina, modifican la concentración sérica de éstos y otros aminoácidos y favorecen un incremento en la concentración de GH e IGF-I circulantes.

10. LITERATURA CITADA

- Anthony, J.C., Anthony, T.G., Kimball, S.R., Vary, T.C., and Jefferson, L.S. 2000. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increase eIF4F formation. *J. Nutr.* 130:139-145.
- Ballerini, M.G. y Ropelato M. G. 2008. El receptor de la hormona de crecimiento humana (hGH) y la proteína de transporte de alta afinidad de la hGH. *RAEM.* 45: 28-46.
- Blomstrand, E., Eliasson, J., Karlsson, H.K., Köhnke, R. 2006. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J Nutr.* 136 (1 Suppl):269S-73S.
- Brameld, J.M., Atkinson, J.L., Saunders, J.C., Pell, J.M., Buttery, P.J., Gilmour, R.S. 1996. Effects of growth hormone administration and dietary protein intake on insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA Expression in porcine liver, skeletal muscle, and adipose tissue. *J Anim Sci.* 74(8):1832-41.
- Breier, B.H., P.D. Gluckman and Bass J.J.. 1988. Influence of nutritional status and oestradiol-17 beta on plasma growth hormone, insulin-like growth factors-I and-II and the response to exogenous growth hormone in young steers. *J. Endocrinol.* 118(2): 243-250.
- Broer, S. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88:249–286.
- Buonomo, F.C. and Baile, C.A.1991. Influence of nutritional deprivation on Insulin- Like Growth Factor I, Somatotropin, and metabolic hormones in swine. *J. Anim. Sci.* 69:755-760.
- Bush, J.A., Kimball, S.R., Suryawan, A., Orellana, R.A. and Davis, T. 2003. Translational control of protein synthesis in muscle and liver of growth hormone treated pigs. *Endocr.* 144: 1273-1283.
- Butler, A.A. and Le Roith, D. 2001. Control of growth by somatotropic axis: Growth Hormone and the Insulin- Like Growth Factors have related and independent Roles. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 141-64.

- Cadena, L.O., Cornejo, S.M., Quiros, M.P., y Rueda O.O.1998. Factor de crecimiento similar a la Insulina: nuevos avances y perspectivas terapéuticas. UNAB. 1:204-208.
- Campbell, R.G., Johnson, R.J., King, R.H., Taverner, M.R., and Meisinger, D.J. 1990. Interaction of dietary protein content and exogenous porcine growth hormone administration on protein and lipid accretion rates in growing pigs. J. Anim. Sci. 68: 3217-3225.
- Carrasco, R.S. 2000. Expresión de los genes del receptor de la hormona de crecimiento y del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I bajo restricción nutricional. Tesis de Doctorado en Ciencias-Químicas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Chromiak, A. J., and Antonio, J. 2002. Use of amino acids as growth hormone- releasing agents by athletes. Nutrition. 18: 657-661.
- Combes, S., Louveau, I. and Bonneau, M. 1997. Effect of GH administration on GH and IGF-I receptors in porcine skeletal muscle and liver in relation to plasma GH-binding protein. J. Endocrinol. 155: 19-26.
- Davis, T.A., Fiorotto, M.L., Burrin, D.G., Reeds, P.J. and Bush J.A. 2002. Acute IGF-I infusion stimulates protein synthesis in skeletal muscle and other tissues of neonatal pigs. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 283: E638- E647.
- Drouillard, J.S., Ferrell, C.L., Klopfenstein, T.J., and Britton, R.A. 1991. Compensatory growth following metabolizable protein or energy restrictions in beef steers. J. Anim. Sci. 69:811-818.
- Eigenmann, J.E., de Bruijne, J.J., and Froesch, E.R. 1985. Insulin like growth factor I and growth hormone in canine starvation. Acta Endocrinol. 108(2):161-166.
- Etherton, T.D. 2004. Somatotropic function: The somatomedin hypothesis revisited. J. Anim. Sci. 82: 239-244.
- Ferry, R.J., Cerri, R.W. and Cohen, P. 1999. Insulin-like growth factor binding proteins: new proteins, new functions. Horm. Res. 51: 53-67.
- Florini, J.R., Ewton D.Z. and Coolican S.A. 1996. Growth Hormone and the Insulin Like Growth Factor System in Myogenesis. Endocr Rev. 17 (5):481-517.

- García, V. H. 2011. Efecto de la adición de Leu a dietas base trigo bajas en proteína cruda en comportamiento y expresión de genes de proteínas transportadoras y miosina para cerdos en crecimiento. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Baja California.
- Guay, F. and Trottier, N.L. 2006. Muscle growth and plasma concentrations of amino acids, insulin-like growth factor-I, and insulin in growing pigs fed reduced-protein diets. *J Anim Sci.* 84:3010-3019.
- Hafez, E.S. 1972. Desarrollo y nutrición animal. Ed. Acribia. España. p.p. 11-18.
- Harel, Z. and Tannenbaum, G.S. 1993. Dietary protein restriction impairs both spontaneous and growth hormone-release in the rat. *Endocrinology.* 133: 1035-1043.
- Hodgkinson, S.C. Davis, S.R., Burleigh, B.D., Henderson, H.V., and Gluckman, P.D. 1987. Metabolic clearance rate of insuline-like growth factor-I in fed and starved sheep. *J. Endocrinol.* 115(2):233-240.
- Hornick, J.L., Van Eenaeme, C., Gérard, O., Dufrasne, I., and Istasse, L. 2000. Mechanisms of reduced compensatory growth. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19:121-132.
- Hossner K. L. Hormonal regulation of farm animal growth, 2005. CABI Publishing, 2da Ed. Inglaterra. pp 43, 46-49, 94-116.
- Kamalzadehab A, Koopsa, W.J., Van Bruchemab, J., Tammingac, S., Zwartart, D. 1998. Feed quality restriction and compensatory growth in growing sheep: development of body organs. *Small Rumin. Res.* 29:71-82.
- Knopf, R. F., Conn, J. W. Fajans, S.S., Floyd, J.C., Guntsche E.M. and Rull, J.A. 1965. Plasma Growth Hormone Response to Intravenous Administration of Amino Acids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 25: 1140-1144.
- Katsumata, M., Kawakami, S., Kaji, Y., Takada, R. and Dauncey, M.J. 2002. Differential Regulation of Porcine Hepatic IGF-I mRNA Expression and Plasma IGF-I Concentration by a Low Lysine Diet. *J. Nutr.* 132: 168-692.
- Lawrence, T.L., and Fowler, V.R. 2002. Growth of farm animals. CAB Int., Wallingford, Oxon, UK. pp 344.

- Le Roith., D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L. and Butler, A (a). 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrinol. Rev.* 22: 53-74.
- Liu, Z.W., Long, D.A., Fryburg, and Barret, E. J. 2006. The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. *J. Nutr.* 136: 212S-217S.
- Louveau, I., and Le Dividich, J. 2002. GH and IGF-I binding in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in response to milk intake level in piglets. *Endocrinol.* 126:310-317.
- Maldonado, J. G., y Jaramillo H. N. 1996. Factores de crecimiento I. *IATREIA.* 9 (2):83-87.
- Maldonado, J. G., y Jaramillo, H. N. 1996. Factores de crecimiento II. Factores Insulinoides de Crecimiento. *IATREIA.* 9 (3): 125-130.
- Marimee, T.J. Zapf, J., and Froesch, E.R. 1982. Insulin-& growth factors in the fed and fasted states. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55 (5):999-1002.
- Méndez, T.V. 2010. Adición de isoleucina a dietas ricas en leucina, en comportamiento productivo e inductor en síntesis de proteína muscular de cerdos. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Baja California.
- Merimee, T.J., Rabinowitz, D., Fineberg, S.E. 1969. Arginine-initiated release of human growth hormone. *N. Engl. J. Med.* 280: 1434.
- Miura, Y., Kato, H. and Noguchi, T. 1992. Effect of dietary proteins on insulin like growth factor-1 (IGF-1) messenger ribonucleic acid content in rat liver. *Br. J. Nutr.* 67:257-265.
- O'Connor, P.M.J., Kimball, S. R., Suryawan, A., Bush, J.A., Davis, T.A. 2003. Regulation of translation initiation by insulin and amino acids in skeletal muscle of neonatal pigs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E40-E53.
- Oksbjerg, N., Gondret, F. and Vestergaard, M. 2004. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domestic Animal Endocr.* 27:219-240
- Ramírez N. L. 2007. Somatotrofina, somatoropina (STH) u hormona de crecimiento (GH) en animales domésticos. *Mundo Pecuario.*3:45-54.

- Sánchez, M.G. 2006. Significado Biológico del eje hormona de crecimiento (GH)/ Hormona de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 30 (114): 101-108.
- Sherlock, M., and Toogood, A. 2007. Aging and the growth hormone/insulin like growth factor-I axis. *Pituitary.* 10:189-203.
- Sticker, L.S.,Thompson, D.L., Fernandez, J.M., Bunting, L.D., and DePew, C.L. 1995. Dietary protein and (or) Energy Restriction in mares: plasma growth hormone, IGF-I, prolactin, cortisol, and thyroid hormone responses to feeding, glucose and epinephrine. *J. Anim. Sci.* 73: 1424-1432.
- Sticker, L.S.,Thompson, D.L., Gentry L.R. 2001. Pituitary hormone and insulin responses to infusion of amino acids and N-methyl-D, L-aspartate in horses. *J. Anim. Sci.* 79:735-744.
- Straus, D.S.1994. Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. *J. FASEB.* 8:6-12.
- Suminiski, R.R., Robertson, R.J., Goss, F.L., et al. 1997. Acute effects of amino acid ingestion and resistance exercise on plasma growth hormone concentration in young men. *Int. J. Sport Nutr.* 7:48.
- Suryawan A, Jeyapalan A, Orellana R, Wilson F, Nguyen H, Davis T. 2008. Leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs by enhancing mTORC1 activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:868-875.
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev.* 15(1):80-101.
- Waters, M.J., Hoang, H. N., Fairlie, D.P., Pelekanos, R.A., and Brown, R.J. 2006. New insights into growth hormone action. *J. Molec. Endocr.* 36:1-7.
- Whang, K.Y., Kim, S.W., Donovan, S.M., McKeith, F.K., and Easter, R.A. 2002. Effects of protein deprivation on subsequent growth performance, gain body components, and protein requirements in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 81:705-716.
- Wilson, F.A, Suryawan A., Orellana, R.A., Nguyen, H.V., Jeyapalan, A.S. and Davis, T. 2008. Fed levels of amino acids are required for somatotropin induced increase in muscle protein synthesis. *Am. J. Physiol Endocr. Metab.* 295: E876-E883.

- Wu, G. 1997. Synthesis of citrulline and arginine from porcine enterocytes of postnatal pigs. *Am. J. Physiol.* 272:G1382-G1390.
- Yang, X., Yang, C., Farberman, A., Rideout, T.C., de Lange, C.F., and Fan, M.Z. 2007. The mammalian target of rapamycin signaling pathway in regulating metabolism and growth. *J. Anim. Sci.* 86: E36-E50.