

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**EFFECTO DE LA DIETA ALTA EN PROTEÍNA INTACTA O CON
AMINOÁCIDOS LIBRES SOBRE LA MORFOLOGÍA INTESTINAL Y
CONCENTRACIÓN SÉRICA DE AMINOÁCIDOS EN CERDOS BAJO
CONDICIONES DE ESTRÉS POR CALOR**

PRESENTA
YURI DIANA VILLALOBOS MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

MAYO, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**EFFECTO DE LA DIETA ALTA EN PROTEÍNA INTACTA O CON
AMINOÁCIDOS LIBRES SOBRE LA MORFOLOGÍA INTESTINAL Y
CONCENTRACIÓN SÉRICA DE AMINOÁCIDOS EN CERDOS BAJO
CONDICIONES DE ESTRÉS POR CALOR**

PRESENTA
YURI DIANA VILLALOBOS MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL**

MAYO, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
POSGRADO CONJUNTO**



TESIS

**EFFECTO DE LA DIETA ALTA EN PROTEÍNA INTACTA O CON
AMINOÁCIDOS LIBRES SOBRE LA MORFOLOGÍA INTESTINAL Y
CONCENTRACIÓN SÉRICA DE AMINOÁCIDOS EN CERDOS BAJO
CONDICIONES DE ESTRÉS POR CALOR**

**PRESENTA
YURI DIANA VILLALOBOS MARTÍNEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO,

MAYO, 2018

EFFECTO DE LA DIETA ALTA EN PROTEÍNA INTACTA O CON
AMINOÁCIDOS LIBRES SOBRE LA MORFOLOGÍA INTESTINAL Y
CONCENTRACIÓN SÉRICA DE AMINOÁCIDOS EN CERDOS BAJO
CONDICIONES DE ESTRÉS POR CALOR

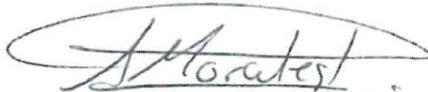
TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL
PRESENTA

YURI DIANA VILLALOBOS MARTÍNEZ

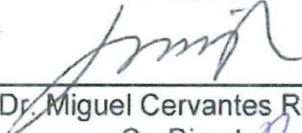
COMITÉ DE TESIS



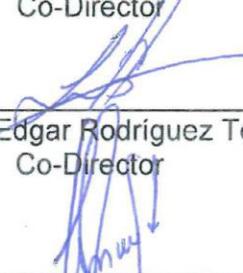
Dr. Hugo Bernal Barragán
Director



Dra. Adriana Morales Trejo
Co-Director



Dr. Miguel Cervantes Ramírez
Co-Director



Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Co-Director

Dr. Fernando Sánchez Dávila
Co-Director

DEDICATORIA

A:

Mis Padres Rosa Martínez y Celso Villalobos, por apoyarme y motivarme a seguir adelante con mis objetivos.

Mis hermanos Ernesto, Natalia, Rosa y Marta, por ser un ejemplo a seguir superándome académicamente.

Mis amigos y compañeros de maestría Lucio, Alejandra, Aimeé, Marcia y Claudia, que hicieron este recorrido fuera más agradable con sus comentarios positivos y alegres.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco al Dr. Hugo Bernal por ver en mí un buen prospecto de tesista, igualmente agradecerle por motivarme a obtener un grado más, por sus enseñanzas y exigencias académicas, con las cuales logre ser mejor profesionalista y mejor persona.

Dr. Fernando Sánchez por estar al pendiente del proyecto y por sus observaciones y comentarios en el escrito.

Dr. Luis Edgar Rodríguez por siempre atender y resolver mis dudas, así como también a motivarme a seguir aprendiendo, pero sobre todo por contar con su apoyo en todo momento.

Dra. Adriana Morales y al Dr. Miguel Cervantes por permitirme formar parte de su cuerpo académico y llevar acabo mi trabajo de campo en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC, igualmente agradezco las enormes aportaciones de conocimiento y de igual manera por estar al pendiente de la realización de este trabajo.

MC. Nydia Vázquez, por apoyarme a resolver dudas que en ocasiones me surgían, pero aún más por la gran ayuda que me brindo en mi trabajo de campo y acompañarme en ese momento que más lo necesite.

Al Posgrado en Conjunto Facultad de Veterinaria – Facultad de Agronomía por brindarme los servicios de los laboratorios de Histopatología, Inmunología y Nutrición y Calidad de los Alimentos, los cuales requerí para el proceso de mis muestras.

A Conacyt por el apoyo económico que me otorgó para la realización del presente trabajo.

ABREVIATURAS

EC	Estrés por calor
Fpm	Frecuencia por minuto
TER	Transpitelial Electrical Resistance
ROS	Reactive oxygen species
ATP	Trifosfato de Adenosina
Arg	Arginina
His	Histidina
Iso	Isoleucina
Leu	Leucina
Lis	Lisina
Met	Metionina
Fen	Fenilalanina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Val	Valina
Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Acido aspártico
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Acido glutámico
Gly	Glicina

Pro	Prolina
Ser	Serina
Tyr	Tirosina
PI	Proteína intacta
AAL	Aminoácidos libres
CS	Concentración sérica
ON	Óxido nítrico
LPS	Lipopolisacáridos
µm	Micrómetros
µg/mL	Microgramos por mililitro
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
mL	Mililitro

ÍNDICE

ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ABSTRACT.....	XII
RESUMEN.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Termorregulación y Estrés por calor.....	3
2.2. Morfología intestinal.....	4
2.3. Absorción de aminoácidos.....	5
2.4. Concentración sérica de aminoácidos.....	7
2.5. Efectos en los parámetros productivos.....	10
2.6. Estrategias nutricionales.....	11
2.7. Absorción de aminoácidos por el intestino delgado.....	11
2.8. Aminoácidos esenciales y no esenciales.....	12
2.9. Funciones de los aminoácidos.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
3.1. Hipótesis.....	17
3.2. Objetivo General.....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1. Ubicación del experimento.....	19
4.2. Manejo de los animales.....	19
4.3. Tratamientos.....	20
4.4. Toma de muestras.....	22
4.5. Toma de muestra de tejido intestinal y proceso histológico.....	23
4.6. Toma de Fotografías microscópica de los tejidos.....	28
4.7. Mediciones de vellosidades y criptas.....	28
4.8. Análisis de la concentración de aminoácidos.....	30
4.9. Análisis estadístico.....	31

5.	RESULTADOS	32
5.1.	Temperatura ambiental y humedad relativa.....	32
5.2.	Rendimiento productivo	34
5.3.	Morfología del intestino delgado	35
5.4.	Concentración sérica de aminoácidos.	37
5.5.	Concentración sérica de metabolitos	41
6.	DISCUSIÓN.....	45
6.1.	Temperatura y comportamiento productivo	45
6.2.	Morfología intestinal.....	46
6.3.	Concentración sérica de aminoácidos y metabolitos no proteicos.....	47
7.	CONCLUSIONES	54
8.	PERSPECTIVAS	55
9.	LITERATURA CITADA	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Cantidades de los ingredientes utilizados en las dietas para los tratamientos.....	21
Cuadro 2.	Análisis químico calculado de las diferentes dietas.....	21
Cuadro 3.	Cantidad de aminoácidos (g) suplementados en la dieta del T2.....	22
Cuadro 4.	Protocolo de toma de sangre realizado a los animales del tratamiento 2 (AAL).....	23
Cuadro 5.	Baños de alcohol etílico realizados para el procesamiento de estudios histológico de los tejidos.	25
Cuadro 6.	Baños de tejidos en soluciones de alcohol etílico y xilol, realizados para el procesamiento de estudios histológico de los tejidos.....	25
Cuadro 7.	Soluciones utilizadas para el proceso de tinción de los tejidos de epitelio intestinal (duodeno, yeyuno e íleon).....	27
Cuadro 8.	Efecto de las dietas en los parámetros productivos	35
Cuadro 9.	Efecto de las dietas en la morfología del intestino delgado en condiciones de estrés por calor	36

Cuadro 10.	Concentración sérica de aminoácidos esenciales ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en fase de absorción (2030 y 2130 h) y fase post-absorción (1700 h), de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AAL, en condiciones de estrés por calor.	38
Cuadro 11.	Concentración sérica de aminoácidos no-esenciales ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en fase de absorción (2030 h y 2130 h) y fase post-absorción (1700 h), en cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AAL, en condiciones de estrés por calor.....	39
Cuadro 12.	Cambios en la concentración sérica de aminoácidos esenciales ($\mu\text{g}/\text{mL}$) entre la fase post-absorción (1700 h) y fase de absorción (2030 y 2130 h), de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AAL, en condiciones de estrés por calor.	40
Cuadro 13.	Cambios en la concentración sérica de aminoácidos no-esenciales ($\mu\text{g}/\text{mL}$) entre la fase post-absorción (1700 h) y fase de absorción (2030 h y 2130 h), de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AAL, en condiciones de estrés por calor.....	41

Cuadro 14.	Concentración sérica de metabolitos no proteicos (µg/mL) en fase de absorción (2030 h y 2130 h) y fase post-absorción (1700 h), en cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AAL, en condiciones de estrés por calor.....	43
Cuadro 15	Cambios en la concentración sérica de metabolitos no proteicos (µg/mL) en fase post-absorción (1700 h) y fase de absorción (2030h y 2130 h), en cerdos alimentados con dietas bajas en proteínas con AAL en condiciones de estrés por calor.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Muestra del trazo realizado por Image J en un corte histológico del intestino delgado (rojo cripta y negro vellosidad).	30
Figura 2.	Variación de la temperatura mínima y máxima durante el periodo de experimentación. Los valores mostrados corresponden a las medias de las temperaturas obtenidas durante las 24 h y registradas cada 15 min	33
Figura 3.	Variación de la humedad relativa mínima y máxima durante el periodo de experimentación. Los valores mostrados corresponden a las medias de las temperaturas obtenidas durante las 24 h y registradas cada 15 min.	33
Figura 4.	Variación de la temperatura y humedad durante las 24 h del día. Los valores mostrados corresponden a las medias de los datos obtenidos de todo los 20 días del experimento.	34

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of the dietary protein level on intestinal morphology and serum concentration of free amino acids (AA) of heat stress (HS) pigs. Twelve pigs with 47 ± 0.2 kg body weight were used during the summer season in the Mexicali valley, with highest temperatures superior to 40 °C. There were 2 treatments: 1, high protein (23%), wheat-soybean meal diet (HP); 2, low protein (11.5%), wheat-soybean meal-free AA diet (LP). All pigs were fed twice a day, at 0700 and 1900 h, 600 g each time. The experiment lasted 20 d. Blood samples were collected from all pigs at 1700 (post-absorptive phase), and 2030 and 2130 h (absorptive phase) to analyze the serum concentrations (SC) of free AA. At the end, the pigs were slaughtered and 5-cm segments from duodenum, jejunum and ileum were collected for histologic analyses. The height and width of duodenum and jejunum villi tended to be higher ($P \leq 0.10$) in pigs fed the LP diet, but they did not differ in ileum. The SC of Arg ($P = 0.009$), Lis ($P = 0.005$), Fen ($P = 0.011$), Thr ($P = 0.022$), Gln ($P = 0.050$) and Pro ($P = 0.019$), was different between samples collected at 1700 or 2130 h. These data show that low protein AA supplemented diets have positive effects on the intestinal morphology of HS pigs. Also, the SC of AA in HS pigs had significantly reduced values for Arg, Lys, Phen, Asn, Gln and Pro in the preprandial phase compared with the absorption phase.

RESUMEN

Se evaluó el efecto del nivel de proteína de la dieta sobre la morfología intestinal y concentración sérica de aminoácidos en fase preprandial y de absorción en cerdos bajo condiciones de estrés por calor (EC). El experimento de 20 días se realizó en verano en Mexicali, B.C. cuando la temperatura ambiental supera los 40 °C. Se utilizaron seis cerdos de 47 ± 0.2 kg de peso por tratamiento: 1, dieta trigo-pasta de soya, alta (23%) en proteína (AP); 2, dieta trigo-pasta de soya y aminoácidos libres (AAL), baja (11.5%) en proteína. Diariamente se ofrecieron 600 g de alimento a las 0700 h y 600 g a las 1900 h. Se analizó el contenido de aminoácidos en suero en etapa preprandial con sangre de los cerdos colectada a las 1700 h, y en etapa de absorción en sangre colectada a las 2030 h y 2130 h. Al finalizar, los cerdos fueron sacrificados y se colectaron muestras de duodeno, yeyuno e íleon para por análisis histológicos. En íleon de los cerdos que consumieron AAL se incrementó el área de vellosidad ($P=0.006$), el ancho de vellosidad ($P= 0.001$) y el ancho de cripta ($P= 0.006$). La concentración sérica de aminoácidos esenciales mostró un descenso significativo entre las 1700 h y las 2130 h en los aminoácidos esenciales Arg ($P= 0.009$), Lis ($P= 0.005$), Fen ($P= 0.011$) y Thr ($P= 0.022$), y en los aminoácidos no esenciales Asn ($P= 0.002$), Gln ($P= 0.050$) y Pro ($P= 0.019$). Se concluye que el uso de dietas bajas en proteína y suplementadas con AAL tiene efectos positivos en la morfología intestinal de cerdos en EC. Además, la CS de aminoácidos en cerdos bajo EC, reflejó un descenso significativo de ciertos aminoácidos (Arg, Lis, Fen, Thr, Asn, Gln y Pro) en la fase preprandial con respecto a la fase de absorción.

1. INTRODUCCIÓN

El estrés por calor en cerdos (EC) es una condición que tiene un impacto negativo en la producción al afectar el bienestar del animal, ocasionando que los animales bajen su rendimiento productivo (Huynh et al., 2005, Renaudeau et al. 2012). Su consumo de alimento se ve disminuido, obteniendo menor peso y afectando su salud en general. Se ha registrado también aumento en la mortandad. Las pérdidas ocasionadas por este fenómeno fueron estimadas considerando que las muertes provocadas al año por el estrés por calor son del orden de 0.5%, así como pérdidas en el crecimiento de 5 kg en los animales bajo esta condición. Cervantes et al., (2016), basándose en estimaciones previamente calculadas por St.Pierre et al., (2013), y teniendo en cuenta que en México más del 80% de la producción se hace en temporadas de calor, calcularon una pérdida económica de 100 millones de pesos anuales en la industria porcina en México.

El proceso fisiológico de termorregulación en los porcinos no es muy eficiente, en comparación con otros mamíferos, al no tener la posibilidad de sudar, debido a sus glándulas sudoríparas queratinizadas (Wolp *et al.*, 2012). Los procesos fisiológicos que se desencadenan al detectar el aumento en la temperatura corporal estimulan las neuronas sensibles a los cambios de temperatura del núcleo preóptico del hipotálamo (Troy *et al.*, 2010), con lo cual se aumenta la frecuencia respiratoria (jadeo), la frecuencia cardiaca, y se redirecciona el flujo sanguíneo hacia la piel y extremidades (Ooue *et al.*, 2007).

El aumento del flujo sanguíneo hacia la periferia ocasiona que órganos internos queden desprovistos de irrigación, siendo afectado sobre todo el sistema

digestivo, y provocando que las células del tejido epitelial queden sin aporte de nutrientes, resultando esto en daño al epitelio por apoptosis de los enterocitos. La apoptosis disminuye el área de absorción de nutrientes, al reducir la altura de las vellosidades y la profundidad de criptas (Yu *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2014).

La baja capacidad de absorción de nutrientes y el daño en el epitelio intestinal, se asocia con hallazgos obtenidos en ensayos realizados a nivel molecular, en donde se observó incrementos en la expresión de proteínas de choque térmico (HSP) y alteración en la expresión de transportadores de aminoácidos en intestino, hígado y tejido hepático (Morales *et al.*, 2014). De acuerdo con Morales *et al.*, (2016), la disminución en la expresión de los transportadores de aminoácidos catiónicos y neutros b⁰⁺ AT, deriva en una menor capacidad de absorción de aminoácidos.

Al estudiar procesos de absorción a nivel de la digesta ileal, se registra una pérdida endógena de ciertos aminoácidos (Arg, Thr y Lis). También se observó reducción de aminoácidos libres en suero sanguíneo, proponiéndose que efectivamente hay una disminución de las concentraciones de diversos aminoácidos en cerdos (Morales *et al.*, 2016b).

Estudios previos (Ferreira *et al.*, 2007) proponen que la reformulación de las dietas para cerdos, reduciendo el contenido de proteína, y suplementando aminoácidos cristalinos (sintéticos), podría ser una estrategia para mitigar los efectos del estrés por calor. Con ello se propone mejorar la absorción y utilización de los aminoácidos, reducir la excreción de nitrógeno (Ren *et al.*, 2014).

2. ANTECEDENTES

2.1. Termorregulación y Estrés por calor

La zona de termoneutralidad se define como el rango de temperatura en el cual la producción normal de calor del animal se encuentra en equilibrio con la pérdida de calor hacia ambiente, sin que el animal tenga necesidad de incrementar la tasa de calor corporal producido (Mount *et al.*, 1974).

El estrés es definido como una respuesta fisiológica del animal a estímulos externos adversos y constantes, alterando su equilibrio fisiológico (Selye, 1976).

El estrés por calor ocurre cuando existe la presencia de elevada temperatura en el ambiente, y puede intensificar al existir alta humedad relativa en el ambiente.

De esta forma se provoca un desbalance entre la cantidad de calor que fluye en el ambiente y el calor generado por los procesos metabólicos propios del animal (Renaudeau *et al.*, 2012, Neinaber y Hahn, 2007).

En cerdos la temperatura corporal es un parámetro indicativo de la capacidad de un individuo de generar y eliminar calor. La medición de la temperatura corporal se ha usado para determinar si un cerdo se encuentra bajo estrés por calor (Yu *et al.*, 2010, Wilson y Crandall, 2011), utilizando diferentes técnicas para registrarla, ya sea la toma de temperatura rectal (Pearce *et al.*, 2014), superficie corporal a través de cámaras térmicas (Yu *et al.*, 2010), de tejido subcutáneo y de órganos internos a través de un termógrafo colocado debajo de la piel o en cavidad abdominal por medio de procedimientos quirúrgicos (Morales *et al.*, 2015; 2016).

Los cerdos de entre 25 y 100 kg son animales homeotermos que requieren de una temperatura ambiental de entre 18 y 22 °C. Al exceder este rango de temperatura se desencadenan procesos fisiológicos originados al estimular las neuronas del núcleo preóptico del hipotálamo. Primeramente, se aumenta el flujo sanguíneo hacia la piel y las extremidades, con lo que perderá calor por medio de convección y radiación. Posteriormente, se presenta una respiración rápida superficialmente (jadeo), con lo cual se pierde calor por evaporación, al aumentar de 30 frecuencias por minuto (fpm) en estado de termoneutral, a 180 fpm bajo temperatura de 32°C con humedad relativa del 80% (Huynh *et al.*, 2005).

2.2. Morfología intestinal

Con la finalidad de disipar calor cuando la temperatura ambiental es alta, ocurre un cambio en el flujo sanguíneo y éste incrementa en piel y extremidades. Como resultado, la irrigación hacia el tracto gastrointestinal se reduce, lo que causa un bajo aporte de nutrientes hacia el tejido epitelial. Esto ocasiona hipoxia y un daño consiguiente a las células del epitelio intestinal, causando que algunos enterocitos inicien el proceso de apoptosis. En consecuencia, a esto, el epitelio sufre descamaciones y necrosis, y su integridad se ve afectada (Yan *et al.*, 2006).

Aplicando la técnica de Resistencia Eléctrica Transepitelial (TER, Transpítelial Electrical Resistance), para determinar el ajuste entre las capas de células epiteliales y endoteliales en los tejidos, Pearce *et al.*, (2013) determinaron en cerdos expuestos a estrés por calor de 35 °C por 24 h una reducción de la integridad intestinal de un 52% en la sección del íleon.

El daño del epitelio también se ha observado en estudios de histopatología del intestino delgado de cerdos bajo estrés por calor, observando disminución del tamaño de las vellosidades y de la profundidad de las criptas (Yu *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2013). En otro trabajo bajo condiciones de estrés por calor a 30 °C, redujeron en 15% la altura de las vellosidades intestinales de yeyuno, en comparación con animales en zona de termoneutralidad (Cui y Gu. 2015). Todo ello tiene un efecto negativo al reducir la capacidad del intestino de absorber nutrientes. Al mismo tiempo, la pérdida en la integridad del epitelio permite la entrada de patógenos al organismo afectando en general la salud del animal (Lambert. 2008).

2.3. Absorción de aminoácidos

La absorción de nutrientes en el intestino delgado, y en especial los aminoácidos, se realizan a través de transportadores específicos para grupos o aminoácidos específicos. Por ejemplo, el sistema de transporte $b^{0,+}$, independiente de sodio, es el de mayor expresión en las células epiteliales para la absorción de aminoácidos catiónicos como lisina, arginina e histidina. El sistema de transporte de aminoácidos AT intercambia leucina (Leu) por lisina (Lis) (Torras-Llort *et al.*, 2001). La absorción de Lis y Arg por $b^{0,+}$ AT esta acoplada con la salida de Leu del enterocito (Pineda *et al.*, 2004). A nivel molecular, el estrés por calor puede afectar la expresión de los transportadores de aminoácidos y, por tanto, la absorción de estos nutrientes.

Morales *et al.*, (2014) demostraron que la abundancia del mRNA mensajero que codifica para el transportador de aminoácidos b^{0,+} AT en la membrana intestinal es afectada en condiciones de calor, obteniendo una disminución del 15% en comparación con cerdos en termoneutralidad. La abundancia del mRNA mensajero de los transportadores de aminoácidos es un indicativo de su actividad de absorción de los aminoácidos (Dave *et al.*, 2004). La inadecuada capacidad de absorción de aminoácidos se relaciona con la pérdida de enterocitos, específicamente en disminución de la altura de vellosidades. La disminución en la abundancia del mRNA mensajero que codifica para estos transportadores b^{0,+} AT es representativa de incapacidad para absorber los aminoácidos necesarios para la síntesis de nuevas proteínas (Morales *et al.*, 2014).

El estudio de digestibilidad ileal de aminoácidos se realiza para determinar su absorción en intestino delgado, para ello se extrae contenido intestinal que llega hasta el íleon, y se analiza la cantidad de aminoácidos presentes, los cuales representan a los aminoácidos de la dieta no absorbidos, pero además proteínas endógenas no digeridas (Stein *et al.*, 2007).

Morales *et al.*, (2016) demostraron que animales expuestos a temperaturas de entre 28.1 a 47.0 °C tuvieron una disminución en la digestibilidad ileal de arginina (Arg) e histidina (His) de origen endógeno en comparación de los animales en termoneutralidad.

La comprobación de la pérdida de estos aminoácidos mediante estos estudios hace más notorio el impacto del estrés por calor en la reducción de la digestión y reabsorción de aminoácidos de las proteínas endógenas. También se presume

una reducción en la capacidad de digerir proteínas del alimento, asociada a una disminución en la altura de las vellosidades y del área de absorción (Yu *et al.*, 2010, Pearce *et al.*, 2014), así como a la disminución de los transportadores de aminoácidos b^{0,+} AT (Morales *et al.*, 2014).

2.4. Concentración sérica de aminoácidos

El análisis de la concentración de aminoácidos libres en suero se realiza en diferentes bioensayos para observar la eficiencia de absorción por parte del intestino delgado. Los resultados obtenidos de este análisis contribuyen a entender cómo el organismo está utilizando los aminoácidos ingeridos en las dietas (Yen *et al.*, 2004; García-Villalobos *et al* 2012; Morales *et al.*, 2014). En condiciones normales de salud, los aminoácidos en plasma sanguíneo se mantienen en concentraciones relativamente constantes en fase postabsorción (Wu *et al.*, 2009).

Algunos trabajos en condiciones de estrés por calor han demostrado que algunos aminoácidos se vuelven deficientes e incluso otros se encuentren elevados, como se observó en trabajos realizados por Morales *et al.*, (2014), quienes alimentaron cerdos con dietas suplementadas con L-lisina y L- treonina y bajo alimentación restringida (1.10 kg/día) durante 19 días en temperaturas de entre 42° a 45 °C, y reportaron que en estas condiciones se redujo la concentración de Lis en 47% y 82% de metionina (Met), así también un incrementó del 38% la concentración de isoleucina (Ile), 49% de Leu y 110% valina (Val). La disminución de Lis se explicó en parte porque este aminoácido fue deficiente en la dieta

además de que se registró una disminución en los transportadores $b^{0,+}$ AT, haciendo factible este resultado. Además, el aumento de Leu también pudo haber sido causa de ello, ya que la absorción de Lis se da por la salida de Leu (cambio antiporte) del enterocito (Torras-Llort *et al.*, 2001), y al no haber suficiente leucina, este aminoácido no sale de la célula, quedando así presente en circulación sistémica, dando por lo tanto concentraciones elevadas en suero. Posiblemente el aumento de Val e Ile podría explicarse por tener un comportamiento parecido a Leu ya que estos tres aminoácidos pertenecen al grupo de aminoácidos neutros.

Morales *et al.*, (2014) concluyeron que la disminución de Met en sangre podría relacionarse también con la disminución de transportadores para este aminoácido.

La concentración de aminoácidos también se ha estudiado en diferentes fases metabólicas. Morales *et al.*, (2016) analizaron la concentración de aminoácidos en cerdos bajo condiciones de calor en la fase de absorción (2 a 3 horas después del consumo de alimento) y en la fase postabsorción (10 horas después del consumo de alimento). Se observó una disminución del 23% de Lis y 30% para Arg y Treonina (Thr) en etapa de absorción; en la etapa postabsorción se observó aumento de Arg (20%), His (40%) y Met (62%) en comparación con cerdos en termoneutralidad (Morales *et al.*, 2016). Se presume que estos resultados están relacionados con la disminución de los transportadores de aminoácidos sistema de transporte $b^{0,+}$ AT (Morales *et al.*, 2014), encargado de absorber la Lis y Arg (Böer, 2008).

Dado que Arg es un precursor de poliaminas estimulantes de la proliferación celular en epitelio intestinal, se atribuye que en situaciones de estrés por calor existe una demanda mayor de arginina, necesaria para la regeneración adecuada del epitelio intestinal. Se ha comprobado que el 40% de este aminoácido no es capaz de entrar a circulación sistémica debido a que es ocupado por las células intestinales para mantener la integridad intestinal y crecimiento de las vellosidades (Wu *et al.*, 2009). Arginina es parte de la enzima óxido nítrico sintasa (Wu *et al.*, 1998). El óxido nítrico es un potente vasodilatador utilizado por el cerdo para distribuir la irrigación sanguínea hacia la periferia para disipar el calor. Además este compuesto funciona como antiinflamatorio en el tracto gastrointestinal (Li *et al.*, 2007) probablemente durante el estrés por calor, cuando se ha reportado incremento en la permeabilidad intestinal provocada por los lipopolisacáridos (LPS) y que ocasionan un proceso inflamatorio (Pearce *et al.*, 2013).

La disminución de la concentración de Thr se atribuyó preliminarmente al hecho de que ante situaciones de estrés por calor se tiene una mayor secreción de mucina-2 (Pearce *et al.*, 2014), una glucoproteína rica en treonina, cuya síntesis podría estar asociada con la disminución sérica de este aminoácido (Faure *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2016), el cual, en condiciones normales es retenido en el intestino en un 60% (Wang *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2010.).

La concentración de AA libres en la fase post-absorción se puede relacionar con la capacidad que tienen las células para usar los AA para su metabolismo (Reverter *et al.*, 2000). Ambos aminoácidos Arg y Met son requeridos para la

formación de antioxidantes como creatina (Lawler *et al.*, 2002), por lo que su síntesis requiere grandes cantidades de arginina (Wu *et al.*, 2009). Metionina participa en esta síntesis como principal donador de grupos metilo para la formación de creatina (Brosnan and Brosnan 2007). Kikusato y Toyomizu (2013) reportaron que el estrés por calor provoca un aumento del estrés oxidativo por la sobre producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species) en el músculo esquelético, provocando este efecto negativo de la disminución de aminoácidos.

2.5. Efectos en los parámetros productivos.

Los cerdos mantenidos en climas cálidos reducen el consumo de alimento, con el fin de reducir la generación de calor por el metabolismo. Con ello se impacta negativamente en la ganancia de peso (Huynh *et al.*, 2005). Cervantes *et al.*, (2016) observaron una reducción de 18% del consumo de alimento y una ganancia de peso 30% menor respecto a cerdos en termoneutralidad.

La pérdida de peso se atribuye en a la reducción en el consumo de alimento y al daño al epitelio intestinal (reducción en la longitud de las vellosidades), que provoca ineficiencia en la absorción de aminoácidos. También se ha reportado disminución de los transportadores de lisina y leucina, los aminoácidos más abundantes en la proteína muscular (Mahan y Shields 1998), con la consecuencia de disminución del crecimiento (Morales *et al.*, 2016).

2.6. Estrategias nutricionales

La modificación en las dietas es hasta ahora la estrategia para mitigar los efectos negativos del rendimiento productivo de cerdos en condiciones de calor. En estas condiciones se procede a disminuir los niveles de proteína cruda y suplementar con aminoácidos libres, con el fin de mantener el rendimiento productivo y reducir la excreción de nitrógeno (Ferreirat *et al.*, 2007). El uso de aminoácidos libres es una alternativa para reducir la generación de calor por efecto de la digestión de proteínas, misma que genera más calor que los carbohidratos y lípidos (Stahly y Cromwell, 1987).

La suplementación de aminoácidos en su forma cristalina permite contrarrestar la pérdida de aminoácidos endógenos reportados por Morales *et al.*, (2016) así como también la utilización de aminoácidos como arginina para mantener la integridad intestinal a través de la producción de poliaminas (Wu *et al.*, 2009), la producción de óxido nítrico como vasodilatador (Wu *et al.*, 1998) y el exceso en la producción de mucina-2 (Pearce *et al.*, 2014). Así, al suplementar aminoácidos cristalinos en las dietas, se podrían cubrir las necesidades, tanto para el crecimiento, como para los mecanismos ya descritos para mantener la integridad intestinal.

2.7. Absorción de aminoácidos por el intestino delgado

Los enterocitos son encargados de absorber los aminoácidos presentes en el lumen intestinal hacia el citoplasma celular por medio de transporte activo y difusión facilitada. Los aminoácidos absorbidos por los enterocitos son usados

para la formación de nuevas proteínas y otros metabolitos nitrogenados (óxido nítrico y glutatión) o ser enviados para la obtención de ATP al ciclo de Krebs. Los aminoácidos que entran en circulación vía portal son distribuidos y que se encuentran biodisponibles en los diferentes órganos y tejidos (Wang *et al.*, 2014).

2.8. Aminoácidos esenciales y no esenciales

Por definición, un aminoácido se entiende como un nutriente que contiene un grupo amino y un grupo ácido. El concepto de proteína ideal es generalmente aceptado para estimar los requerimientos de cada aminoácido. Aunque los aminoácidos esenciales adecuados en la dieta han sido definidos ampliamente en los últimos años, menos atención se ha prestado a definir adecuadamente las funciones de los aminoácidos no esenciales, a pesar de que suministran más de la mitad del nitrógeno total ingerido (Wu *et al.*, 2009).

Los aminoácidos esenciales se entienden como aquellos que no pueden ser sintetizados en cantidades necesarias en las células, por lo que tienen que ser proporcionados en la dieta. Los aminoácidos no esenciales son aquellos que pueden ser sintetizados *de novo* por las células. Esta clasificación ha ido cambiando, ya que aunque ciertos aminoácidos pueden ser sintetizados, en condiciones adversas (estados reproductivos, enfermedades, estrés) son necesaria su suplementación, entrando una tercera clasificación denominados aminoácidos condicionalmente esenciales (Wu *et al.*, 2009).

Para los cerdos, los aminoácidos esenciales son la histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Los aminoácidos no esenciales son alanina, asparagina, aspartato, serina. Los aminoácidos arginina, cisteína, glutamato, glutamina, glicina y tirosina son considerados como condicionalmente esenciales, ya que en algunas etapas de desarrollo y bajo condiciones de estrés y deficiencias nutricionales no son sintetizados las cantidades adecuadas para cubrir los requerimientos del cuerpo (Ren *et al.*, 2013).

2.9. Funciones de los aminoácidos

La función general de los aminoácidos es servir como elementos constitutivos para la síntesis de proteínas en los tejidos del animal. Además, los aminoácidos individualmente tienen funciones específicas. Por ejemplo, se ha propuesto que pueden actuar como moléculas señalizadoras que regulan la traducción del ARNm, algunos otros son precursores para la síntesis de neurotransmisores y algunas hormonas (Wu *et al.*, 2009).

Alanina es sustrato para la neoglucogenesis, y participa en el ciclo de Krebs formándose en piruvato por catabolismo de alanina transaminasa (Ren *et al.*, 2013).

La arginina es un aminoácido precursor para la síntesis de glutamato y prolina y otros aminoácidos no proteinogénicos como la ornitina y citrulina (Wu y Morris 1998), tiene participación en la síntesis de antioxidantes como la creatina (Lawler

et al., 2002), funciona como precursor de poliamidas involucradas en la proliferación celular y formación de óxido nítrico (Wu *et al.*, 2009).

La asparagina es el aminoácido precursor del aspartato, glutamina y amonio en el ciclo de urea (Ren *et al.*, 2013).

El ácido aspártico participa en ciclo de Krebs resultado de una conversión realizada por la enzima aspartato transaminasa a oxalacetato. En el ciclo de la urea se condensa con la citrulina en arginosuccinato por la enzima arginosuccinato sintasa. (Ren *et al.*, 2013).

La cisteína es precursora para la biosíntesis de taurina, del glutatión y sulfuro de hidrogeno (H₂S). La importancia de la taurina son sus funciones protectoras, como evitar el estrés oxidativo (Laidlaw *et al.*, 1998). El glutatión, tripéptido formado glicina, glutamato y cisteína, el cual el 30 a 50% del total utilizado por el cuerpo es dirigido a cumplir con biosíntesis de este (Fukagawa *et al.*, 1996). El glutatión participa en la activación de Linfocitos T y controlar las especies reactivas de oxígeno (Ren *et al.*, 2013).

El ácido glutámico o glutamato es sintetizado a partir de Pro e His y Arg. En el enterocito es el mayor sustrato para síntesis de citrulina. Arginina es también uno de los precursores de glutamina en el tejido musculo esquelético, corazón, hígado, tejido adiposo y cerebro (Wu *et al.*, 1995).

La glutamina es el principal precursor de ATP en el enterocito, aún más que la glucosa y los ácidos grasos (Wu *et al.*, 1995), también se tiene referencia de que es requerido para modular las células inmunes (monocitos, neutrófilos,

macrófagos y linfocitos; Wu *et al.*, 2010) y colabora en biosíntesis de nucleótidos como donador de nitrógeno (Ren *et al.*, 2013).

La glicina es precursora para la síntesis de serina, formación de glutatión, cretina, purina y el grupo hemo de las hemoglobinas (Ren *et al.*, 2013). La histidina, aminoácido más abundante de la hemoglobina, precursor de glutamato e histamina está involucrado procesos inflamatorios. (Ren *et al.*, 2013).

Los aminoácidos isoleucina, leucina y valina de cadena ramificada colaboran en la síntesis de acetil-CoA, ácido acetoacético, propinil-CoA y succinil CoA, llevado a cabo por una transaminación en la presencia de alfa-cetoglutarato que permite la síntesis de glutamato (Anderson y Johnson, 1983).

La lisina es un precursor necesario para acetoacetil-CoA, carnitina y cadaverina. La carnitina tiene función en el transporte de ácidos grasos desde el citosol a la matriz mitocondrial en el proceso de la beta oxidación (Vaz y Wanders, 2002). La cadaverina es una poliamina producida por la microbiota intestinal a partir de estos aminoácidos (Ren *et al.*, 2013).

La metionina es precursora del succinil CoA en el ciclo de Krebs, homocisteína, cretina y carnitina. Es un precursor para las reacciones de metilación, al igual que para la síntesis de cisteína. (Finkelstein *et al.*, 1988)

La fenilalanina tiene la función de ser un precursor de acetoacetil-CoA y tirosina; además, es necesaria para la biosíntesis de dopamina, noradrenalina y adrenalina (Lou, 1994).

La prolina es un aminoácido precursor de glutamato, importante para la síntesis de colágeno en su forma hidroxilada, dando como producto una hidroxiprolina.

La Serina es un aminoácido que puede ser metabolizado como piruvato, necesario para la síntesis de cisteína, esfingolípidos y esfingosinas (Ren *et al.*, 2013). La treonina es el aminoácido más abundante en las mucinas, y es precursor de la síntesis de glicina y acetil CoA (Wang *et al.*, 2007).

El triptófano es precursor para acetoacetil CoA y acetil CoA, principalmente necesarios para la síntesis neurotransmisores como la 5-Hidroxitriptamina (serina), triptamina, hormona melatonina y vitamina B3 o niacina (Yao *et al.*, 2011). La tirosina es necesaria en la activación de neurotransmisores, como la epinefrina y noraepinefrina, el pigmento de la melanina y la hormona tiroxina (Ren *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

El 80% de la producción porcina en México se realiza en regiones en las que estacionalmente la temperatura ambiental puede ser muy alta en épocas de verano. Los efectos negativos causados por el estrés por calor son de alta importancia económica ya que, como consecuencia del proceso fisiológico de la termorregulación, se deriva un daño al epitelio intestinal, resultando en un descenso de la capacidad de absorber nutrientes, por lo que se presenta un menor incremento de peso, y se afecta el estado de salud en general.

Los cerdos son los animales más afectados por las altas temperaturas, de tal forma que al diseñar estrategias nutricionales para atenuar los efectos del estrés por calor son de importancia, como al reformular las dietas ante este tipo de condiciones, con la suplementación de aminoácidos en forma libre, y bajando los niveles de proteína intacta, se puede mejorar su bienestar ante estas situaciones, dando como resultado un mejor rendimiento productivo.

Los estudios científicos han demostrado que los aminoácidos en su forma libre tienen un impacto positivo en el epitelio intestinal, mejorando su integridad y morfología, por lo que al proporcionarlos en las dietas para cerdos en condiciones estrés por calor se pretende tener como resultado mejor condición del epitelio intestinal y por lo tanto mejor absorción de los nutrientes.

3.1. Hipótesis

En cerdos sometidos a estrés por calor, la formulación de dietas con bajo contenido de proteína, y suplementada con aminoácidos libres, mejorará la

eficiencia de utilización proteica de las dietas, y la morfología intestinal, comparada con la dieta formulada con niveles altos de proteína intacta.

3.2. Objetivo General

Evaluar el efecto que una dieta formulada con proteína intacta, y otra con un menor contenido de proteína, suplementada con aminoácidos libres, tienen sobre los parámetros productivos y sobre la morfología de las vellosidades intestinales de cerdos bajo condiciones de estrés por calor.

3.2.1. Objetivos particulares

Evaluar el efecto de dietas con alto nivel de proteína y otra dieta con niveles bajos de proteína suplementada con aminoácidos en forma libre en condiciones de estrés por calor constante, sobre el alto, anchura y área de las vellosidades y profundidad, anchura y área de las criptas, así como también en la ganancia de peso y conversión alimenticia. Evaluar la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia.

Determinar la concentración sérica de aminoácidos esenciales y no esenciales de la dieta con aminoácidos en forma libre, en fase preprandial y de absorción en condiciones de estrés por calor (EC).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del experimento.

El bioensayo se realizó en las instalaciones del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicado en el Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California. El clima dominante en Mexicali es cálido muy seco con temperaturas altas extremas (SEMARNAT). De acuerdo con Morales et al., (2013), en el mes de julio la temperatura más alta es de 40°C a 45°C (de las 14:00 a 19:00 h del día) y la más baja es de 20°C a 26°C (de 3:00 a 7:30 horas). El experimento comenzó el día 7 de julio y finalizó el 27 de julio del año 2016.

Durante el tiempo de experimentación se registraron las temperaturas presentes, en las salas de experimentación, utilizando un Higrotermógrafo digital (Thermotracker HIGRO; iButtonLink LLC, Whitewater, WI, USA). Este dispositivo registra la temperatura ambiental y la humedad relativa cada 15 minutos en una base de datos, la cual fue exportada a un archivo Excel (Microsoft office 2013).

4.2. Manejo de los animales.

Se utilizaron 12 cerdos hembras y machos (Landrace White x Duroc), con peso inicial promedio de 46 kg, distribuidos al azar y divididos en dos grupos que correspondían a sus respectivos tratamientos. Todos los cerdos fueron alojados en corrales individuales (1.2 m ancho, 1.2m largo y 1.0 m de alto) equipados con comederos de acero inoxidable y bebederos de chupón y colocados en condiciones de estrés por calor. Los animales utilizados en el presente

experimento fueron manejados tomando en cuenta las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062 ZOO-1999-2001), “Especificaciones para la producción y cuidado y uso de animales de laboratorio”.

La alimentación fue controlada durante los 20 días del experimento, ofreciendo diariamente un total 1200 g de alimento otorgado en dos raciones de 600 g c/u.

Una ración se ofreció a las 0700 h, y la siguiente a las 1900 h.

4.3. Tratamientos

Las dietas experimentales correspondientes a ambos tratamientos consistieron en:

T1).- Dieta con nivel alto de proteína (21.9 % de PC) sin aminoácidos cristalinos (AP).

T2).- Dieta baja en proteína (13.7 % de PC), adicionada con aminoácidos cristalinos (AAL).

Cuadro 1. Cantidades de los ingredientes utilizados en las dietas para los tratamientos

Ingredientes %	Dietas	
	T1	T2
Trigo	63.90	91.82
Harina de Soya	30.30	4.00
Aceite de canola	3.00	-
Aminoácidos	-	1.58
Carbonato de calcio	1.25	1.4
Ortofosfato	1.00	0.65
Sal yodatada	0.30	0.35
Vitaminas y minerales*	0.2	0.2
Total	100	100

*Esta premezcla aportaba por kg de alimento: 4,800 UI vitamina A, 800 UI vitamina de D3, 4.8 UI de vitamina E, 1.6 mg vitamina K3, 4 mg de riboflavina, 7.2 mg ácido D-pantoténico, 16 mg Niacina, 12.8 µg vitamina B12, 64 mg Fe, 4 mg Cu, 4 mg Mn, 0.36 mg I y 0.13 Se.

Cuadro 2. Análisis químico calculado de las diferentes dietas

Composición química	T1	T2
EM(kcal/ME)	3132	3305
PC %	21.93	13.68
Fibra	2.92	2.47
Fósforo	0.59	0.41
Calcio	0.9	0.8

Cuadro 3. Cantidad de aminoácidos (g) suplementados en la dieta del T2

Aminoácido	Cantidad (g)
L-Lis	0.78
L-Trp	0.26
DL-Met	0.13
L-Thr	0.05
L-Fen	0.03
L-Leu	0.13
L-Ile	0.06
L-His	0.03
L-Val	0.11
Total	1.58

4.4. Toma de muestras

Para analizar el contenido de aminoácidos libres en suero se colectaron muestras de sanguíneas de la vena yugular externa, y para ello se requirió el siguiente material: un lazo para la sujeción del animal, agujas hipodérmicas desechables de 38 x 1.2 mm, aplicador de aguja; tubos estériles de 5 cc sin anticoagulante y guantes de látex. Se realizó la toma de muestras de sangre para la obtención de los sueros de los animales del Tratamiento 2 (AAL), con el protocolo mostrado en el Cuadro 4:

Cuadro 4. Protocolo de toma de sangre realizado a los animales del tratamiento 2 (AAL)

Fase metabólica	Día	Hora del día		
		1700	2030	2130
Post-absorción	9	1° Toma de sangre		
Absorción	10	2° Toma de sangre		
Absorción	12	3° Toma de sangre		

En cada uno de los días de la toma de sangre al terminar se procedía a llevar los tubos con las muestras de sangre al laboratorio para la separación del suero. Para esto se utilizó una centrifuga (CK 12, Desago, Mexico); a 500 x g a 4°C por 10 minutos, para separar el suero, usando pipetas desechables Pasteur de 2ml. El suero se almacenó en refrigeración a -20°C en criotubos de 2 ml previamente identificados.

4.5. Toma de muestra de tejido intestinal y proceso histológico

El día 27 de julio se realizó el pesaje final de los cerdos para proceder a su sacrificio y obtención de muestras de intestino (duodeno, yeyuno e íleon). El método de sacrificio fue por aturdimiento eléctrico (Aturdidor Best & Donovan, Cincinnati, OH, USA). Se utilizó un voltaje de 629 V durante 2-3 segundos; para

pasar al desangrado con una duración de 1:30 minutos y finalmente proceder a técnica de necropsia y obtención del tejido intestinal. Todo esto fue llevado a cabo en un tiempo no mayor a 10 minutos. Las muestras tejido intestinal se tomaron de un tamaño aproximado de 10 cm de cada sección (duodeno, yeyuno e íleon). De esta muestra tomó una sección en un corte longitudinal y la otra de manera transversal. Los especímenes se almacenaron en formol buffereado en PBS al 10% en frascos individuales previamente identificados por sección y animal. Estas muestras se destinaron para su proceso histológico de rutina mediante de tinción HE (Ref. Luna Armed Forces) en el laboratorio de histología y patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UANL de la siguiente manera:

Los tejidos fijados se lavaron en agua corriente, para después realizar cortes transversales del intestino delgado. Posteriormente se siguió con la deshidratación del tejido, utilizando baños de alcohol etílico en concentraciones crecientes usando un procesador automático de tejidos con sistema al vacío (Leica TP1020) de acuerdo con el Cuadro 5.

Cuadro 5. Baños de alcohol etílico realizados para el procesamiento de estudios histológico de los tejidos.

	Sustancia	Tiempo (hora)
1	Alcohol etílico al 70 %	12
2	Alcohol etílico al 70 %	12
3	Alcohol etílico al 80 %	1
4	Alcohol etílico al 90 %	1
5	Alcohol etílico al 100 %	1
6	Alcohol etílico al 100%	1

Al término de la deshidratación se procedió a la aclaración con xilol de acuerdo con el Cuadro 6.

Cuadro 6.- Baños de tejidos en soluciones de alcohol etílico y xilol, realizados para el procesamiento de estudios histológico de los tejidos

	Sustancia	Tiempo (horas)
1	Alcohol – xilol (50 % - 50 %)	1
2	Xilol	1
3	Xilol	1

La inclusión en parafina se realizó utilizando un casete de inclusión para la colocación del tejido y después se agregó parafina líquida. El casete se dejó enfriar a temperatura ambiente; una vez firme fue necesario colocarlo unos

minutos dentro del refrigerador para facilitar su corte con el micrótomo. Los cortes realizados por el micrótomo se recogieron cuidadosamente con el porta objetos en un baño de flotación con agua de 40° a 45° C.

Posteriormente y después de desparafinar con xilol, los cortes se tiñen con hematoxilina, de acuerdo con el orden indicado en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Soluciones utilizadas para el proceso de tinción de los tejidos de epitelio intestinal (duodeno, yeyuno e íleon).

	Sustancia	Tiempo (minutos)
1	Alcohol – xilol	5
2	Alcohol al 100 %	2
3	Alcohol 96 %	2
4	Agua destilada	2
5	Hematoxilina de Harris	1
6	Agua de llave	1
7	Agua destilada	2 inmersiones
8	Alcohol acido	2 inmersiones
9	Agua destilada	2
10	Agua amoniacal	1 inmersión rápida
11	Agua destilada	1
12	Eosina	1
13	Alcohol 96%	2 inmersiones
14	Alcohol al 96 %	2 inmersiones
15	Alcohol al 100 %	2 inmersiones
16	Etanol – xilol	2
17	Xilol	2
18	Xilol	2

Una vez teñidos, los cortes se montaron y sellaron en resina sintética (CTR Scientific). Estas laminillas se dejaron reposar para que el xilol y así queden listas para su observación al microscopio.

Todos los pasos mencionados se realizaron por separados por cada sección del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon)

4.6. Toma de Fotografías microscópica de los tejidos.

El análisis de fotográfico de los cortes intestinales fue realizado en el laboratorio Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

La observación del tejido se realizó en un microscopio óptico (Primo Star Zeiss, HBO50 México). Con una cámara adaptada de la marca Canon se tomaron fotografías de varios segmentos que permitieran observar las vellosidades completas, para así obtener las mediciones. Las imágenes se almacenaron en un formato JPEG y se descargaron a una computadora con el fin de tomar las mediciones de las vellosidades y criptas.

4.7. Mediciones de vellosidades y criptas.

Las imágenes de cada sección fueron tomadas para medir la altura y ancho de cada vellosidad y criptas. Se utilizó el Software Image J2 (Curtis *et al.*, 2017). Este programa permite conocer la medida de un área histológica que está en pixeles a una unidad de longitud, en este caso se calibró para que los pixeles de la sección fueran convertidos a micrómetros.

La calibración de este programa consiste en elegir el tipo de microscopio utilizado de la barra de herramientas. Brevemente la barra de herramientas ofrece opciones en la cual muestra la opción de longitud en micras, la cual fue seleccionada. Este paso requiere que la imagen se abra desde el programa oprimiendo las teclas "Control" y "O" lo que permite cargar la imagen seleccionada desde el sitio de almacenamiento.

Una vez descargada la imagen en el programa, se selecciona la opción calibrar imagen de pixeles a micras μ . El siguiente paso consistió en seleccionar el área de la altura de la vellosidad, la cual permitió hacer un trazo de forma libre en la sección donde se deseaba hacer la medición.

La sección trazada permitió conocer el tamaño de la altura de cada vellosidad (Figura 1). La medida se registró oprimiendo las teclas "Control" + "M" y el programa expresó la longitud en una lista. Los datos obtenidos finalmente se exportaron a una hoja de cálculo (Microsoft office Excel 2013).

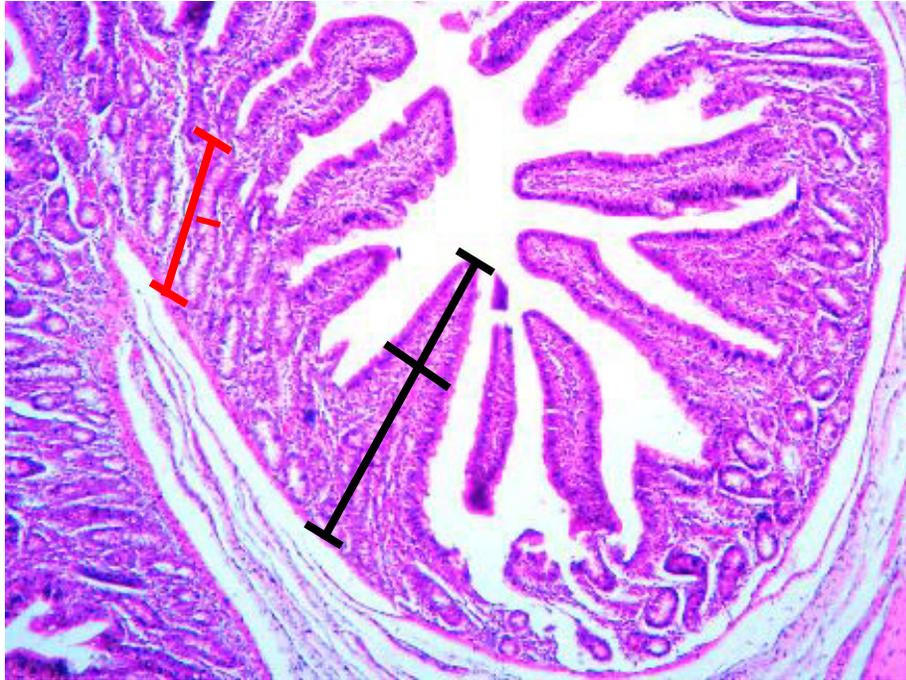


Figura 1. Muestra del trazo realizado por Image J en un corte histológico del intestino delgado (rojo cripta y negro vellosidad). Las líneas verticales ilustran la longitud y las líneas horizontales el ancho.

4.8. Análisis de la concentración de aminoácidos.

La concentración sérica de aminoácidos se analizó en un laboratorio externo (Universidad de Missouri) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del tipo de intercambio iónico (método 98.30; AOC, 2006), usando una columna de litio analizador de 20 aminoácidos Biochrom (biochrom Ltd., Cambrige, UK), y buffers de litio. El HPLC es un equipo que permite separar componentes termolábiles de una mezcla.

El proceso de separación se basa en la interacción de los aminoácidos con un soporte fuertemente ácido, en primera instancia se extraen los aminoácidos de

carácter ácidos, después los hidroxilados, seguido de los neutros y por último los básicos.

Las muestras de suero liofilizado fueron disueltas en ácido sulfosalicílico y posteriormente centrifugadas durante 30 minutos a 10,000 revoluciones por minuto, a una temperatura de 20 – 25°C, con la finalidad de precipitación de las proteínas. Una vez precipitadas las proteínas, cada uno de los aminoácidos se identifica con ninhidrina (hidrato de tricetohidríndeno) con la cual forman complejo de color morado, que absorbe una λ de 570 nm con los aminoácidos primarios, con los aminoácidos secundarios y prolina e hidroxiprolina con un complejo color amarillo los cuales absorben 440 nm.

4.9. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se evaluarán estadísticamente aplicando una prueba de t-Student para muestras independientes, usando SPSS. Diferencias de medias fueron evaluadas a un nivel de significancia de 0.05.

5. RESULTADOS

5.1. Temperatura ambiental y humedad relativa

Todos los cerdos fueron sometidos a las condiciones climatológicas naturales de la zona de Mexicali, Baja California. Las temperaturas registradas durante los 20 días del periodo de experimentación tuvieron un rango máximo de 41 °C y una mínima de 26 °C (Figura 2), los días 4 y 15 fueron los días más cálidos del periodo experimental. La humedad relativa registrada osciló entre 11% y 81% (Figura 3). Las horas que presentaron temperaturas más bajas durante el día fueron entre las 0300 y las 0700 h con una temperatura promedio de 28 °C y acompañado con una humedad relativa entre los 65 % y 70 %, siendo la humedad más elevada presente durante el día. Las horas más cálidas se presentaron entre las 1300 y 1800 h con temperaturas medias entre los 37 y 38 °C, pero presentando la humedad relativa más baja del día entre 31% y 32% (Figura 5).

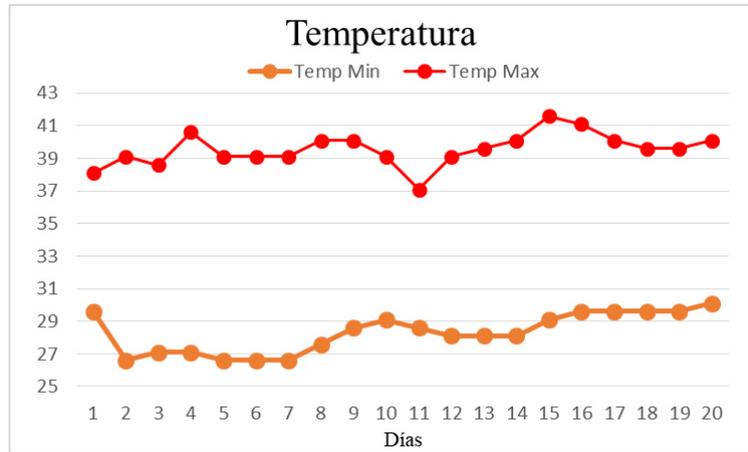


Figura 2. Variación de la temperatura mínima y máxima durante el periodo de experimentación. Los valores mostrados corresponden a las medias de las temperaturas obtenidas durante las 24 h y registradas cada 15 min.

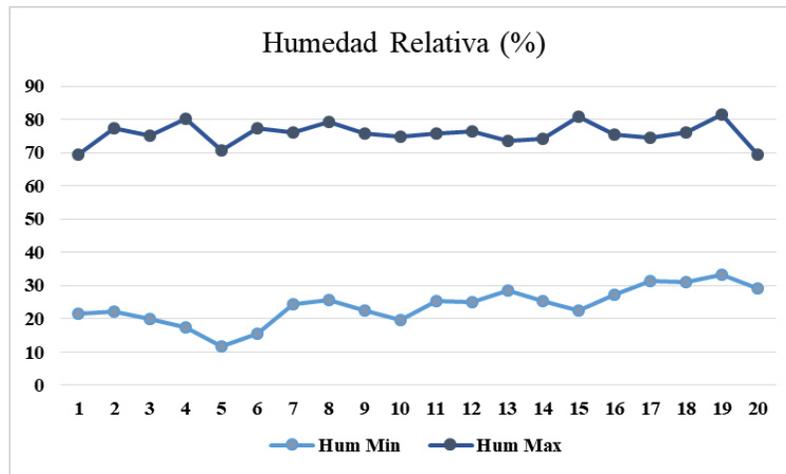


Figura 3. Variación de la humedad relativa mínima y máxima durante el periodo de experimentación. Los valores mostrados corresponden a las medias de las temperaturas obtenidas durante las 24 h y registradas cada 15 min.

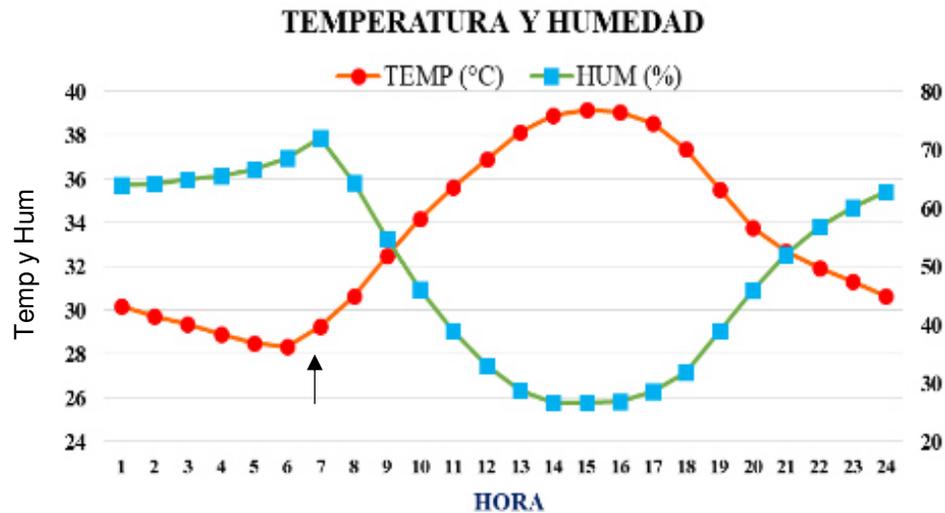


Figura 4. Variación de la temperatura y humedad durante las 24 h del día. Los valores mostrados corresponden a las medias de los datos obtenidos de todo los 20 días del experimento. Las flechas negras señalan la temperatura promedio presente durante la hora de la alimentación.

5.2. Rendimiento productivo

Todos los cerdos recibieron la misma cantidad de alimento (1200 g) aunque hubo alimento rechazado. El efecto en los parámetros productivos resultados de la dieta alta en proteína (21%) y la adición de aminoácidos en forma libre se pueden observar en el Cuadro 8. El peso inicial para el grupo del tratamiento de proteína intacta fue de 47.1 kg y para el grupo del tratamiento de aminoácidos libres fue 46.7 kg aproximadamente. Las dietas evaluadas (AP vs AAL) tuvieron resultados similares ($P=0.982$) en ganancia diaria de peso (ADG). El consumo diario de alimento (CDA) fue 1152 g en PI y 1157 g para AAL ($P= 0.321$). La relación de

ganancia diaria y consumo de alimento (G:C) fue similar para AP y AAL (P= 0.921).

Cuadro 8. Efecto de las dietas en los parámetros productivos

Variable	AP	AAL	EEM	Valor de P
Peso inicial (kg)	47.2	46.8	1.176	0.441
Peso final (kg)	58.6	58.2	1.051	0.492
Ganancia diaria (g)	580	573	0.670	0.982
Consumo diario (g)	1152	1157	6.093	0.321
Ganancia / consumo	0.49	0.50	0.30	0.923

5.3. Morfología del intestino delgado

Los resultados de la altura y ancho de las vellosidades y criptas se muestran en Cuadro 9. El promedio de la altura de las vellosidades y profundidad de las criptas no fueron diferentes ($P > 0.05$) entre los tratamientos; pero la dieta con AAL resultó ser más ancho en las vellosidades ($P=0.001$) y una tendencia igualmente para las criptas ($P=0.006$).

Cuadro 9. Efecto de las dietas en la morfología del intestino delgado en condiciones de estrés por calor

Variables	Tratamientos		EEM	Valor de <i>P</i>
	AP	AAL		
Duodeno (μm)				
Longitud de Vellosidades	208	249	15.983	0.065
Ancho de Vellosidades	53	63	3.716	0.057
Área de Vellosidades (μm^2)	12469	15623	1483.816	0.119
Profundidad de Criptas	101	88	11.760	0.373
Ancho de Criptas	17	19	1.360	0.006
Área de Criptas (μm^2)	1699	1671	291.358	0.939
Yeyuno (μm)				
Longitud de Vellosidades	220	251	220.371	0.102
Ancho de Vellosidades	59	66	3.159	0.163
Área de Vellosidades (μm^2)	13901	16659	1296.480	0.119
Profundidad de Criptas	76	67	5.200	0.187
Ancho de Criptas	21	21	1.152	0.861
Área de Criptas (μm^2)	1653	1396	152.361	0.230
Íleon (μm)				
Longitud de Vellosidades	194	210	12.955	0.321
Ancho de Vellosidades	54	76	4.720	0.001
Área de Vellosidades (μm^2)	16659	15727	1232.376	0.006
Profundidad de Criptas	56	60	5.839	0.542
Ancho de Criptas	19	24	1.669	0.477
Área de Criptas (μm^2)	977	1426	976.982	0.036

5.4. Concentración sérica de aminoácidos.

La concentración sérica de aminoácidos esenciales de los animales alimentados con la dieta baja en proteína y suplementada con aminoácidos libres (AAL) se muestra en el Cuadro 10, para aminoácidos esenciales; y en el Cuadro 11, los aminoácidos no esenciales.

Tomando como base comparativa las concentraciones séricas de los aminoácidos a las 1700 h (en fase post-absorción), las concentraciones séricas de Arginina (Arg), Lisina (Lis), Fenilalanina (Fen) y Treonina (Thr) se mostró un cambio significativo ($P < 0.05$) a las 2130 h, es decir 2.5 horas después de que los animales fueron alimentados (fase absorción) las cuales se muestran en el Cuadro 12. Los incrementos numéricos de concentración sérica de aminoácidos esenciales entre las 2030 y las 2130 h no alcanzaron significancia estadística ($P > 0.05$).

Cuadro 10. Concentración sérica de aminoácidos esenciales ($\mu\text{g/mL}$) en fase de absorción (2030 y 2130 h) y fase post-absorción (1700 h), de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AAL, en condiciones de estrés por calor.

Aminoácidos	Hora del muestreo			EEM	Valor de <i>P</i>
	1700	2030	2130		
Arginina	18.25 ^b	23.82 ^{ab}	30.11 ^a	2.821	0.030
Histidina	8.67	9.57	11.31	1.007	0.202
Isoleucina	15.44	15.19	18.72	1.477	0.313
Leucina	21.98	24.09	26.97	2.246	0.316
Lisina	8.83 ^b	15.49 ^{ab}	17.86 ^a	1.990	0.015
Metionina	2.25	2.510	3.38	0.449	0.067
Fenilalanina	9.92 ^b	11.00 ^{ab}	13.35 ^a	0.957	0.034
Treonina	19.40	24.49	28.21	2.449	0.066
Triptófano	5.89	7.460	7.763	7.763	0.094
Valina	36.20	40.17	43.45	3.405	0.347

Cuadro 11. Concentración sérica de aminoácidos no-esenciales ($\mu\text{g/mL}$) en fase de absorción (2030 h y 2130 h) y post-absorción (1700 h), en cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AAL, en condiciones de estrés por calor.

Aminoácidos	Hora del muestreo			EEM	Valor de <i>P</i>
	1700	2030	2130		
Alanina	55.58	69.66	69.61	5.552	0.152
Asparagina	7.09 ^b	10.76 ^{ab}	15.34 ^a	1.425	0.006
Ácido Aspártico	5.18	4.63	4.37	0.445	0.443
Cisteína	0.31	0.44	0.92	0.252	0.229
Glutamina	42.73	52.04	58.46	5.211	0.134
Ácido Glutámico	17.03	15.27	13.70	1.557	0.345
Glicina	97.87	109.42	118.14	11.238	0.459
Prolina	43.08 ^b	58.76 ^{ab}	62.25 ^a	5.136	0.041
Serina	20.77	26.62	28.37	3.369	0.279
Tirosina	12.37	13.46	15.56	1.164	0.179

Cuadro 12. Cambios en la concentración sérica de aminoácidos esenciales ($\mu\text{g/mL}$) entre la fase post-absorción (1700 h) y fase de absorción (2030 y 2130 h), de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AAL, en condiciones de estrés por calor.

Aminoácidos	Cambios en la concentración			EEM	Valor de <i>P</i>		
	2030 vs 1700	2130 vs 1700	2130 vs 2030		C1	C2	C3
Arginina	5.57	11.86	6.29	3.99	0.182	0.009	0.136
Histidina	0.90	2.64	1.74	1.42	0.535	0.083	0.241
Isoleucina	-0.24	2.74	2.98	2.09	0.909	0.209	0.174
Leucina	2.12	4.99	2.87	3.18	0.515	0.137	0.380
Lisina	6.66	9.03	2.37	2.81	0.032	0.005	0.414
Metionina	0.26	1.51	1.25	0.63	0.682	0.031	0.068
Fenilalanina	1.55	3.91	2.35	1.35	0.267	0.011	0.103
Treonina	5.09	8.81	3.72	3.46	0.162	0.022	0.299
Triptófano	1.56	1.87	0.30	0.85	0.086	0.044	0.727
Valina	3.97	7.25	3.28	4.81	0.423	0.153	0.506

* C1: 2030 vs 1700; C2: 2130 vs 1700; C3 2130 vs 2030

En el caso de los aminoácidos no esenciales las concentraciones séricas se muestran en el Cuadro 11. Los cambios en la concentración entre en las distintas fases se pueden observar en Cuadro 13, mostrando diferencia significativa para Asn, Gln y Pro a las 2130 h, cuando fue mayor ($P < 0.05$) que la de las 1700 h. Las diferencias numéricas de mayor concentración de los otros aminoácidos no esenciales no alcanzaron significancia estadística ($P > 0.05$).

Cuadro 13. Cambios en la concentración sérica de aminoácidos no-esenciales ($\mu\text{g/mL}$) entre la fase post-absorción (1700 h) y fase de absorción (2030 h y 2130 h), de cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AAL, en condiciones de estrés por calor.

Aminoácidos	Cambios en la concentración			EEM	Valor de <i>P</i>		
	1700 vs 2030	1700 vs 2130	2030 vs 2130		C1	C2	C3
Alanina	14.08	14.03	-0.05	7.85	0.093	0.094	0.995
Asparagina	2.95	7.53	4.58	1.42	0.164	0.002	0.038
Ácido Aspártico	-0.55	-0.81	-0.26	0.63	0.398	0.219	0.686
Cisteína	0.13	0.61	0.48	0.36	0.723	0.108	0.197
Glutamina	9.31	15.72	6.41	7.37	0.226	0.050	0.398
Ácido Glutámico	-1.76	-3.33	-1.57	2.20	0.437	0.152	0.488
Glicina	11.55	20.27	8.73	15.89	0.479	0.222	0.591
Prolina	15.68	19.17	3.49	7.26	0.048	0.019	0.637
Serina	5.85	7.60	1.75	4.76	0.239	0.132	0.719
Tirosina	1.09	3.18	2.10	1.65	0.520	0.072	0.222

* C1: 2030 vs 1700; C2: 2130 vs 1700; C3 2130 vs 2030

5.5. Concentración sérica de metabolitos

La concentración sérica de 16 metabolitos resultantes del metabolismo de aminoácidos en cerdos alimentados con la dieta baja en proteína, adicionada con aminoácidos libres (AAL) se muestra en el Cuadro 14. Los cambios en la concentración en las distintas fases metabólicas 1700 vs 2030 h, 1700 h vs 2130 h y 2030 h vs 2130 se muestran en el Cuadro 15. En el caso de ornitina se registró

un incremento significativo ($P=0.028$) en la fase absorción (a las 2130 h), en comparación con la fase preprandial (1700 h).

Cuadro 14. Concentración sérica de metabolitos no proteicos ($\mu\text{g/mL}$) en fase de absorción (2030 h y 2130 h) y fase post-absorción (1700 h), en cerdos alimentados con dietas bajas en proteína adicionadas con AAL, en condiciones de estrés por calor.

Metabolitos	Hora del muestreo			EEM	Valor de <i>P</i>
	1700	2030	2130		
1-Methyl-Histidina	4.5500	5.9867	6.7533	2.941	0.866
3-Methyl-histina	1.4817	1.6783	1.5633	0.145	0.638
Carnosina	4.6817	4.0483	5.0083	0.443	0.325
Citrullina	10.463	11.397	13.708	1.724	0.412
Cystathionina	0.3733	0.3600	0.3633	0.049	0.980
Homocystina	0.1200	0.1633	0.1583	0.423	0.734
Hydroxylysina	0.5283	0.8583	0.9600	0.303	0.585
Hydroxyprolina	10.988	13.547	12.255	1.592	0.303
Ornitina	12.075	15.643	19.005	2.025	0.084
Phosphoserina	2.9633	3.4483	2.7717	0.271	0.223
Sarcosina	1.6767	2.2750	2.0917	0.426	0.606
Taurina	16.910	18.130	16.442	2.980	0.826
α -Amino-adipic acid	2.6050	3.5450	3.8150	0.534	0.274
α -Amino-n-butiric acid	0.5150	0.7217	0.7183	0.078	0.135
γ -Amino-butiric acid	0.5667	0.6183	0.6550	0.104	0.836
Urea	260.90	254.67	269.74	26.370	0.921

* C1: 2030 vs 1700; C2: 2130 vs 1700; C3 2130 vs 2030

Cuadro 15. Cambios en la concentración sérica de metabolitos no proteicos ($\mu\text{g/mL}$) en fase post-absorción (1700 h) y fase de absorción (2030 h y 2130 h), en cerdos alimentados con dietas bajas en proteínas con AAL en condiciones de estrés por calor.

Metabolitos	Cambios en la concentración			EEM	Valor de P		
	1700 vs 2030	1700 vs 2130	2030 vs 2130		C1	C2	C3
1-Methyl-Histidina	1.437	2.203	0.767	4.159	0.734	0.604	0.856
3-Methyl-histina	0.197	0.082	-0.115	0.206	0.354	0.696	0.584
Carnosina	-0.633	0.327	0.960	0.627	0.328	0.610	0.146
Citrullina	0.934	3.245	2.311	2.438	0.707	0.203	0.358
Cystathionina	-0.013	-0.010	0.003	0.070	0.852	0.888	0.962
Homocystina	0.043	0.038	-0.005	0.060	0.479	0.531	0.934
Hydroxylysina	0.330	0.432	0.102	0.429	0.453	0.330	0.815
Hydroxyprolina	2.558	1.267	-1.292	1.592	0.129	0.438	0.429
Ornitina	3.568	6.930	3.362	2.864	0.429	0.028	0.258
Phosphoserina	0.485	-0.192	-0.677	0.383	0.224	0.624	0.097
Sarcosina	0.598	0.415	-0.183	0.603	0.336	0.501	0.765
Taurina	1.220	-0.468	-1.688	2.801	0.669	0.869	0.555
α -Amino-adipic acid	0.940	1.210	0.270	0.756	0.233	0.130	0.726
α -Amino-n-butiric acid	0.207	0.203	-0.003	0.110	0.081	0.085	0.976
γ -Amino-butiric acid	0.052	0.088	0.037	0.147	0.730	0.558	0.807
Urea	-6.230	8.840	15.080	37.323	0.869	0.815	0.691

* C1: 2030 vs 1700; C2: 2130 vs 1700; C3 2130 vs 2030

6. DISCUSIÓN

6.1. Temperatura y comportamiento productivo

La temperatura confort del cerdo se encuentra entre los 18°C y 22°C (Huynh *et al.*, 2005); sin embargo, durante el presente trabajo los animales fueron manejados bajo condiciones de ambiente natural de una zona con temperaturas muy extremas durante el de verano, la cual tuvo una media máxima de 41°C y una media mínima de 26°C, lo cual los expuso constantemente a estrés por calor.

Las consecuencias del estrés por calor es la disminución del consumo de alimento. Dado este hecho, en el presente trabajo la cantidad de alimento que se ofreció se calculó tomando como base la porción consumida en termoneutralidad y el efecto el descenso de consumo en EC, y esto basado en trabajos previos reportados por Cervantes *et al.*, (2016).

Respecto al rendimiento productivo (ganancia de peso, consumo diario de alimento), los tratamientos mostraron valores similares para los animales alimentados con proteína intacta en niveles elevados y para los que se les ofreció una dieta con niveles bajos de proteína, pero suplementados con aminoácidos en su forma libre. Esto coincide trabajos realizados por Peng *et al.*, (2016) en cerdos de entre 13 y 35 kg, a los que se les otorgaban diferentes niveles de proteína intacta y suplementada con aminoácidos. Dichos estudios revelaron que no se obtenían mejoría en los parámetros productivos a pesar de la reducción de proteína en la dieta y la sustitución de aminoácidos, siendo éstos los mismos utilizados en el presente trabajo. Sin embargo, en la investigación de Peng *et al.*,

(2016), los animales no fueron expuestos a estrés por calor, sino que solamente se evaluó el comportamiento de la suplementación de aminoácidos libres y diferentes niveles de proteína intacta. Resultados similares también fueron concluidos por Morales et al., (2015) en cerdos en fase de crecimiento. Igualmente, en condiciones de EC a 32.2°C, Ferreira et al., (2007) evaluaron dietas con bajos niveles de proteína y suplementados con aminoácidos libres y tampoco observaron mejora en el consumo diario ni en la ganancia de peso, aun con la suplementación.

6.2. Morfología intestinal

La evaluación de la morfología intestinal (medidas de las vellosidades y criptas) es usada como un reflejo de la condición en la que se encuentra el intestino para sus funciones digestivas (Yut *et al.*, 2010, Pearce *et al.*, 2014). El acortamiento de las vellosidades intestinales puede indicar que el área para absorber nutrientes es menor, y de igual manera la disminución en la profundidad de las criptas significa que se formarán menos células formadoras de vellosidades, expresándose como acortamiento en la longitud de las mismas. (Xia *et al.*, 2005). Yu *et al.*, (2010) reportaron que bajo condiciones de EC había un acortamiento de las vellosidades, de las secciones duodeno, yeyuno e íleon de 6.1%, en comparación con condiciones de termoneutralidad (23°C). En el presente trabajo los cerdos alimentados con la dieta AAL tuvieron resultados favorables en la sección del duodeno, presentando vellosidades de mayor longitud y más anchas, así mismo presentando criptas más anchas que las de cerdos alimentados con

la dieta AP en las características de altura de las vellosidades y profundidad de las criptas. Estos resultados difieren con los Peng *et al.*, (2016) en donde concluyeron que los niveles más bajos de proteína (13%) resultaban en un descenso de la altura de las vellosidades duodenales principalmente ($P < 0.05$), ya que existía una menor cantidad de proteínas de la mucosa intestinal, proponiendo que este suceso se podría deber a la disminución de péptidos que llegan al lumen intestinal y que por lo tanto las células ya no realicen el trabajo de absorción de tripéptidos y dipéptidos (Guay *et al.*, 2006), pero el suceso exacto que nos dé a entender este acontecimiento aún no se ha llegado a explicar. Sin embargo, los cerdos del trabajo de Guay *et al.*, (2006) fueron manejados bajo condiciones de termoneutralidad; en cambio, en el presente trabajo ambas dietas fueron evaluadas bajo condiciones de alta temperatura, y como ya se mencionó, esta condición afecta el epitelio de la mucosa intestinal, sin embargo, al existir una gran demanda metabólica y tal vez al proporcionar aminoácidos en su forma libre, sea causa de que las células intestinales los utilicen más eficientemente para mantener su integridad.

6.3. Concentración sérica de aminoácidos y metabolitos no proteicos.

Los resultados de concentración sérica de aminoácidos, en diferentes horas del día son un reflejo de la capacidad de absorción bajo estrés por calor prolongado. La alimentación se ofreció cada 12 horas (0700 h y 1900 h), considerando estas horas como las menos cálidas del día, presentando un estrés por calor moderado (entre 29°C a 34°C). Las CS de aminoácidos presentes pueden ser consideradas

como los niveles que presentan cerdos en ambientes cálidos durante las 24 horas del día (Cervantes et al., 2017). Los análisis CS de aminoácidos solo se realizaron para el tratamiento de baja proteína suplementada con aminoácidos libres (AAL), obteniendo con ello información acerca de la concentración sérica de los aminoácidos en la fase postabsorción (10 h después del consumo de alimento = preprandial) y en dos tiempos en fase de absorción (1:30 h y 2:30 h después del consumo de alimento), considerando que la concentración sérica de aminoácidos en estado absorción (2 a 3 h postprandial) es un indicador de los aminoácidos digeribles del alimento consumido (García-Villalobos *et al.*, 2012) y esto es una referencia de la capacidad que tiene el intestino delgado para absorber los aminoácidos (Yen *et al.*, 2004).

Los cambios en la CS de aminoácidos se ha informado que sucede por varios sucesos. Morales *et al.*, (2014) demostraron que bajo condiciones de estrés por calor extremo se reduce la expresión de transportadores de aminoácidos (b^{0+} y B^{0+}), impactando esto en la absorción de los aminoácidos de la dieta, que por ello no llegan a la circulación sanguínea.

Morales *et al.*, (2016) reportaron que, en condiciones de EC, la Arg y Thr presentaba una disminución de 30 % en su concentración sérica en comparación con cerdos en termoneutralidad en fase de absorción, atribuyendo esto a que estos aminoácidos son los más requeridos por el individuo antes las situaciones adversas del estrés por calor.

En este trabajo, de igual manera, se calcularon las CS de aminoácidos entre la fase de absorción (2.30 h después de la alimentación) y la fase postabsorción (10

h después la alimentación), mostrando cambios en la concentración entre estas dos tomas para Arg (28.4%) y Thr (40%), siendo también cerdos bajo estrés por calor. En el presente trabajo, los cambios para Arg fueron del 39%, y para Thr, del 28.2% en la fase postabsorción (preprandial) con respecto a la concentración registrada en la fase de absorción (2130 h). Una probable causa para que en el presente trabajo Arg muestre un aumento mayor en la CS en fase de absorción, podría atribuirse a que las dietas ofrecidas en el presente ensayo, contenían mayor cantidad L-Lis en forma libre, lo cual puede aumentar la abundancia de RNA mensajero que codifica para b⁰⁺ en la sección del yeyuno, siendo este el transportador para tal aminoácido (Morales *et al.*, 2015).

En condiciones normales se considera que solamente 40% de Arg entra a circulación, ya que es degradada en el intestino. Este aminoácido es el principal precursor de óxido nítrico (ON), un vasodilatador (Wu *et al.*, 2009), por lo que se puede generar la hipótesis de que los cambios que hayan sido significativos entre fase absorción y postabsorción podrían deberse a que existe una activación para la síntesis de ON y de la circulación sanguínea hacia la periferia, con el fin de disipar el calor en el proceso de termorregulación, así que una posible causa por la cual exista cambios en CS de este aminoácido, podría ser relacionado a que se utiliza en la síntesis de ON y llevar a cabo dicha función (Hall *et al.*, 2001). Morales *et al.*, (2016) demostraron que la CS de este aminoácidos disminuye entre cerdos bajo termoneutralidad y aquellos bajo estrés por calor. Considerando esta información, es de suponer que los resultados del presente trabajo mostraron cambios significativos entre las fases metabólicas (absorción y

postabsorción), solo para algunos aminoácidos, que presumiblemente están cumpliendo dichas funciones.

La Arg es uno de los principales formadores de antioxidantes, como la creatina, la cual puede ser requerida, ya que bajo condiciones de calor existe un aumento en la producción mitocondrial de ROS, las cuales están involucradas en el daño oxidativo celular. Otra función de la arginina es la formación de poliaminas, que cumplen funciones como la proliferación y diferenciación celular (Agostinelli, 2014), por tanto, es posible que exista un mayor requerimiento de este aminoácido para regenerar el epitelio intestinal (Morales *et al.*, 2016).

La Met mostró cambios en la CS significativos entre la fase de postabsorción y absorción, en situaciones normal el 48% de Met ingerida es la que llegará a nivel sistémico, el otro restante es utilizado por el intestino (Stoll *et al.*, 1999). Se propone que los cambios CS de este aminoácido se deban a la participación de este aminoácido en procesos antioxidantes, ya que junto a la Arg son necesarios para la formación del antioxidante la creatina, el cual para llevar a cabo su síntesis, la Met es el donador de los grupos metilos.. (Brosnan y Brosnan, 2007).

El cambio en la CS de Thr (28.2%) entre la fase postabsorción y absorción obtenida en el presente trabajo, fue menor a las publicadas por Morales *et al.*, (2016; 40%). Probablemente una explicación a estos los cambios en la CS en general sea la abundancia de los transportadores de aminoácidos neutros (B^{0+}), que son afectados bajo el estrés por calor (Cervantes *et al.*, 2015). Otra posible explicación a los cambios séricos menores encontrados en el presente trabajo hayan sido que la Thr en la dieta se proporcionó en su forma libre, lo que facilita

su biodisponibilidad. Se ha demostrado que entre mayor sea la disponibilidad de Thr se aumenta la actividad de enzimas catalíticas, por lo tanto, la CS este aminoácido se verá afectado (Munasinghe *et al.*, 2017).

La Thr se ha relacionado con varios procesos que son afectados bajo el estrés por calor, debido posiblemente a que en condiciones de estrés por calor se requiera aún más de este aminoácido para utilizarse como el principal formador de Mucina-2, (Faure *et al.*, 2002), glucoproteína cuya síntesis aumenta en condiciones de calor (Pearce *et al.*, 2014). En el presente trabajo, la información se obtuvo en la fase de postabsorción (2130 h) y absorción (1700 h) un cambio de 30%. Dicho cambio significativo de Thr se explica porque es el principal precursor para la formación de mucina, asociada también al cambio de Pro, ya que esta glucoproteína también es rica en este aminoácido (Morales *et al.*, 2016). En condiciones normales el 60% Thr contenida en la dieta es ocupado en el intestino (Wang *et al.*, 2009), el cual es una cantidad elevado, y es de suponer que en estrés por calor este porcentaje sea aún más eminente.

El cambio en la concentración registrada por Morales *et al.*, (2016) para Lis fue 42%, lo cual fue muy similar a lo registrado en el presente trabajo, obteniendo un cambio de 43%. Este aminoácido mostró un cambio significativo entre las 1700 h (postabsorción) y 2130 h (absorción). Probablemente las diferencias entre ambas fases podría deberse se deba la situación del descenso en la expresión de transportadores (b0+ y AT) de aminoácidos que ocurre ante el estrés por calor (Morales *et al.*, 2014). Estos cambios en los transportadores podría ser la explicación para los cambios en CS de otros aminoácidos, como es el caso Fen

en la cual en el presente trabajo tuvo cambios significativos y concuerda con información en la dimensión en la expresión de los transportadores de aminoácidos neutros (B⁰) (Cervantes *et al.*, 2015)

La CS del Trp mostró un cambio significativo de un 24% entre las 1700 y 2130 h. Trabajo previos realizados por Morales *et al.*, (2016) en CS tomadas en las mismas condiciones del presente estudio, mostraron un cambio entre postabsorción y absorción de 17% en la CS de Trp, lo cual indica una capacidad menor de absorción, pero a diferencia de este trabajo, las dietas que se ofrecieron contenían L-Trp, lo que posiblemente explique la mayor absorción en el presente estudio. Los cambios reflejados entre postabsorción y absorción, se refieren a que el aminoácido Trp es utilizado para la síntesis de 5-Hidroxitriptofano o serotonina y melatonina, neurotransmisores que tienen la función de regular el apetito, procesos digestivos y motilidad gastrointestinal (Sodhi y Sanders-Bush, 2004). El desbalance de este aminoácido podría ser otra razón de la reducción del apetito y del consumo de alimento, y de crecimiento asociados a estrés por calor (Henry *et al.*, 1996; Moehn *et al.*, 2012).

Respecto a los aminoácidos no esenciales, Asn y Gln mostró un cambio significativo de 54% y 27% respectivamente en la CS, entre la fase de absorción y la fase de postabsorción. En un estudio previo, Morales *et al.*, (2016) obtuvieron entre estas mismas fases un cambio solo del 25% para Asn y 21% para Gln en condiciones similares a este estudio. Posiblemente el intestino en circunstancias de estrés por calor requiere más energía y aminoácidos para mantener su integridad. De acuerdo a Rhoads *et al.*, (1995) la estructura de Asn es parecida

a la de Gln y gracias a esta característica puede Asn sustituir a la función de Gln. Este aminoácido es el principal sustrato de los enterocitos para la formación de ATP (Wu *et al.*, 1995), esto podría ser relacionado que ambos aminoácidos se encuentren ejerciendo la función de mantener la integridad del intestino, ante el estrés por calor. Zhu *et al* (2017) reportaron que la suplementación de Asp mejoró la altura de las vellosidades y profundidad de las criptas en condiciones de estrés inducido por Lipopolisacárido, por lo que se puede proponer que Asn podría tener su participación en reconstrucción de tejido epitelial que haya sido dañado en mayor proporción en condiciones de estrés por calor, y es por esta causa que haya reflejado cambios considerables entre las 1700 y 2130 h.

Respecto a los metabolitos no proteicos, solo en el caso de Ornitina hubo cambios significativos entre la fase de absorción y la fase preprandial. Se ha observado que Ornitina es metabolizado en mayor grado en condiciones de estrés por calor, por lo que se ha registrado disminución de su concentración sérica (Morales *et al.*, 2016). Dado que ornitina funciona como sustrato en la formación de poliaminas, esto podría también estar vinculado a la disminución de la Arginina.

7. CONCLUSIONES

Las dietas con altas concentraciones de proteína (21.9%), o bajas concentraciones (13.7%) de proteína y suplementada con aminoácidos, tuvieron efectos similares en parámetros de crecimiento de cerdos sometidos a estrés por calor.

Los efectos en la morfología intestinal, en longitud y ancho de las vellosidades fueron registrados sobre todo en íleon, con vellosidades y criptas más anchas en cerdos que consumieron dietas enriquecidas con aminoácidos (AAL) y una tendencia a mayor longitud de vellosidades en la sección del duodeno.

La CS de aminoácidos de la dieta con AAL mostró cambios significativos entre la fase de absorción (1700 h) y la fase postabsorción (2130h) en Arg, Thr, Tri, y para aminoácidos no esenciales Asn, Pro y Gln, y manteniendo las CS constantes para los aminoácidos restantes en todas las fases.

En la CS de metabolitos no proteicos, se mostró un cambio significativo para ornitina entre la fase de absorción y la fase de postabsorción.

8. PERSPECTIVAS

El aumento en la temperatura ambiental es un acontecimiento presente en nuestro país en cada verano, aún en lugares donde no se presentaban temperaturas altas, y se ha observado que existe una pérdida económica en el sector porcino debido a ello. Expresado lo anterior, es necesario generar información con el fin de mejorar las estrategias que se implementan actualmente, con el objetivo de disminuir las pérdidas económicas. El uso de aminoácidos es una de las estrategias que se han estado proponiendo ante condiciones de EC, ya que los aminoácidos son los nutrientes más importantes para la formación de proteínas. Además de ello, estudios científicos recientes indican que el uso de aminoácidos en niveles más altos y en su forma libre, tienen efecto positivo sobre la condición del epitelio intestinal. También se explicó, que condiciones de EC afectan al cerdo gravemente, dando como resultado una mala absorción o la entrada de patógenos los cuales comprometen su salud.

El conocer los requerimientos de aminoácidos de cerdos bajo EC, a través de la evaluación de las CS en diferentes etapas metabólicas, permite conocer el comportamiento de los aminoácidos para mitigar los efectos del estrés por calor. La información reflejada en la CS brinda información para generar mejores formulaciones de las dietas para cerdos en EC, para con ello mantener la producción porcina adecuada, a pesar de la temperatura, pero sobre todo mejorar la salud y el bienestar de los animales.

Las nuevas formulaciones que pueden ser establecidas a partir de este tipo de investigaciones, que reconsideren también el importante papel de aminoácidos

que son considerados como no esenciales, dado que en estas condiciones de EC sus demandas son más elevadas. Por lo que sería importante plantear el suministro de igual manera que en el caso de los aminoácidos esenciales. El replantear los requerimientos de aminoácidos adecuados para cerdos en climas cálidos, permitirá asegurar que éstos mantengan su homeostasis y crecimiento óptimo.

9. LITERATURA CITADA

- Agostinelli E. 2014. Polyamines and transglutaminases: biological, clinical, and biotechnological perspectives. *Amino Acids* 46:475–485
- Anderson G. H., J. L. Johnston. 1983 Nutrient control of brain neurotransmitter synthesis and function. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 61:271–281.
- AOAC, 2006: *Official Methods of Analysis*, 18th edn. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, p. 2000.
- Bröer, S., 2008: Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological Reviews* 88, 249–286.
- Brosnan, J. T., and M. E. Brosnan. 2007. Creatine: Endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. *Annual. Reviews.* 27:241–261.
- Cervantes, M., M. Cota, N. Arce, G. Castillo, E. Avelar, S. Espinoza, A. Morales. 2016. Effect of heat stress on performance and expression of selected amino acid and glucose transporter, HSP90, leptin and ghrelin in growing pigs. *Journal of Thermal. Biology.* 59: 69-79.
- Cervantes, M., N. Arce, H. García, M. Cota, J. K. Htoo, and A. Morales. 2015. Expression of genes coding for selected amino acid transporters in small intestine, liver, and skeletal muscle of pigs fed excess branched-chain amino acids. *Genetics and molecular research.* 14:9779–9792.
- Cervantes, M., N. Ibarra, N. Vásquez, F. Reyes, E. Avelar, S. Espinoza, A. Morales. 2017. Serum concentrations of free amino acids in growing pigs exposed to diurnal heat stress fluctuations. *Journal of Thermal. Biology.* 69: 69-75.
- Cui, Y., X. Gu. 2015. Proteomic changes of the porcine small intestine in response to chronic stress.. *Journal Molecular endocrinology.* 55, 277-293.

- Curtis T. R., J. Schindelin, M. C. Hiner, B. E. DeZonia, A. E. Walter, E. T. Arena, K. W. Eliceiri. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 18:529.
- Dave, M. H.; Schulz, N.; Zecevic, M.; Wagner, C. A.; Verreyet, F. 2004. Expression of heteromeric amino acid transporters along the murine intestine. *Journal of Physiology* 558: 597-610.
- Faure, M., D. Moënoz, F. Montigon, L. B. Fay, D. Breuillé, P. A. Finot, O. Ballèvre, and J. Boza. 2002. Development of a rapid and convenient method to purify mucins and determine their in vivo synthesis rate in rats. *Analytical Biochemistry*. 307:244–251.
- Ferreira, R.A., Oliveira, R.F.M., Donzele, J.L., Saraiva, E.P., Silva, F.C.O., Orlando, U.A.D., Vaz, R.G.M.V., 2007. Reduction of dietary crude protein levels and amino acid supplementation for 30 to 60 kg barrows maintained in a high environmental temperature. *Basil Journal. Animal. Science*. 36:818–824.
- Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ. 1988. Methionine metabolism in mammals. The methionine sparing effect of cysteine. *Journal Biology Chemistry*. 263(24):11750–11754.
- Fukagawa, NK., A. M. Ajami, V. R. 1996. Young. Plasma methionine and cysteine kinetics in response to an intravenous glutathione infusion in adult humans. *American Journal Physiology* 270: 209–214.
- García-Villalobos, H., Morales-Trejo, A., Araiza-Piña, B.A., Htoo, J.K., Cervantes-Ramírez, M., 2012. Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs. *Archive Animal Nutrition*. 66, 257-270.
- Guay, F., S. M. Donvam, N. L. Trottier. 2006. Biochemical and morphology development are partially impaired in intestinal mucosa from growing pigs fed reduced-protein diets supplemented with crystalline amino acids. *Journal of animal science*. 84: 1749-1760.

- Hall DM, Buettner GR, Oberley LW, Xu L, Matthes RD, Gisolfi CV. 2001. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *American Journal of Physiology*. 280(2):H509-21.
- Henry, Y., B. Seve, A, Mounier, P, Ganier. 1996. Growth performance and brain neurotransmitters in pigs as affected by tryptophan, protein, and sex. *Journal of Animal Science*. 74:2700–2710
- Huynh, T. T.T., A.J.A. Aarnink, M. W. A. Verstegen, W. J. J. Gerrits, M. J. W. Heetkamp, B. Kemp, and T. T. Canh. 2005. Effects of increasing temperatures on physiological changes in pigs at different relative humidity. *Journal of Animal Science*. 83:1385–1396.
- Kikusato, M., and M. Toyomizu. 2013. Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria. *PLoS One* 8(5):e64412.
- Laidlaw, SA, Shultz TD, Cecchino JT, Kopple JD. 1998 Plasma and urine taurine levels in vegans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 47:660–663.
- Lambert, G. P. 2008. Intestinal barrier dysfunction, endotoxemia, and gastrointestinal symptoms: The ‘canary in the coal mine’ during exercise heat-stress. *Medicine Sport Science*. 53:61–73.
- Lawler, J. M., W. S. Barnes, G. Wu, W. Song, and S. Demaree. 2002. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical Biophysics. Research. Communication*. 290:47–52.
- Lou H. C. 1994. Dopamine precursors and brain function in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Acta Paediatrica* 407:86–88
- Mahan, D. C.; Shields Jr., R. G. 1998: Essential and nonessential amino acid composition of pigs from birth to 145 kilograms of body weight, and comparison to other studies. *Journal of Animal Science*. 76:513–521.

- Moehn,S., PB. Pencharz, Ball RO. 2012 Lessons learned regarding symptoms of tryptophan deficiency and excess from animal requirement studies. *Journal of Nutrition* 142(12):2231S–2235S.
- Morales A., L. Buenabad, G. Castillo, N. Arce, B. A. Araiza, J. K. Htoo, and M. Cervantes. 2015. Low-protein amino acid–supplemented diets for growing pigs: Effect on expression of amino acid transporters, serum concentration, performance, and carcass composition. *Journal of Animal Science*. 93(5):2154-2164
- Morales, A., S. e. m. Cota, N. O. Ibarra, N. arce, J. K. Htoo, and M. Cervantes. 2016a. Effect of heat stress on the serum concentrations of free amino acids and some of their metabolites in growing pigs. *Journal of Animal Science*. 94:2835–2842
- Morales, A., F. Grageola, H. Garcia, N. Arce, B. Araiza, J. Yañez y M. Cervantes. 2014. Performance, serum amino acid concentration and expression of selected genes in pair-fed growing pigs exposed to high ambient temperatures. *Journal Animal Physiology and Animal nutrition*. 98(5):928-35
- Morales, A., L. Hernández, L. Buenabad, E. Avelar, H. Bernal, L. H. Baumgard, and M. Cervantes. 2016b. Effect of heat stress on the endogenous intestinal loss of amino acids in growing pigs. *Journal of Animal Science*. 2016.94:165–172.
- Mount, L. E., J. L. Monteith, and L. E. Mount. 1974. The concept of thermal neutrality Heat loss from animals and man. Butterworths, London.p 425-439.
- Munasinghe, L. L., J. L. Robinson, S. V. Harding, J. A. Brunton& R. F. Bertolo. 2017. Protein synthesis in mucin- producing tissues is conserved when dietary threonine is limiting in piglets. *The Journal of Nutrition*. 47, 202–210.

- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-2014). Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación, Norma Oficial Mexicana,
- Ooue, A., T. Ichinose-Kuwahara, A. K. M. Shamsuddin, Y. Inoue., T. Nishiyasu, S. Koga, N. Kondon. 2007. Changes in blood flow in a conduit artery and and superficial vein of the upper arm during passive heating in humans. *European Journal of Applied Physiology*. 101: 97-103.
- Pearce, S. C., V. Mani, R. L. boddicker, J. S. Jhonson, T.E. Weber, J. W. Ross, R. P. Rhoads, L. H. Baumgard and N. K. Glaber. 2013. Heat stress reduces glucose transport in growing pigs. *PIOs one*. 8(8): e702
- Pearce, S.C., N.K. Gabler, J.W Ross, J. Escobar, J.F. Patience, R.P. Rhoads, L. Baumgard, 2013. The effects of heat stress and plane of nutrition on metabolism in growing pigs. *Journal of Animal Science*. 91:2108– 2118.
- Pearce, S.C., V. Mani, T.E. Weber, R.P. Rhoads, J.F. Patience, L.H. Baumgard, N.K. Gabler, 2013b. Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *Journal of Animal Science*. 91, 5183–5193.
- Peng X., L. Hu, Y. Liu, C. Yan, Z. F. Fang, Y. Lin, S. Y. Xu, J. Li, C. M. Wu, D. W. Chen, H. Sun, D. Wu. L. Q. Che.2016. Effects of low-protein diets supplemented with indispensable amino acids on growth performance, intestinal morphology and immunological parameters in 13 to 35kg pigs. *Journal Animal*. 10: 1812-1820.
- Pineda, M., C. A. Wagner, A. Broer, P. A. Stehberger, S. Kaltenbach, J. L. Gelpi, R. Martin Del Rio, A. Zorzano, A. Palacin, A. Lang, and S. Broer. 2004. Cystinuria-specific rBAT (R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b^{0,+}AT. *Biochemical. Journal* 377:665–674.

- Ren W., Y. Li, Y. Yin, F. Blachier. 2013. Struktur, metabolisme and function of amino acids: an Overview. In: The book Nutritional and physiological functions of amino acids in pigs. Pp 91-108.
- Ren, R., L. Chuang, X. Zeng, L. Yue, X. Mao, S. Quiao and J. Wang. 2014. Amino acids modulates the intestine proteome associated with immune and stress response in weaning pig. *Molecular Biology Rep.* 41:3611–3620.
- Renaudeau, D., Anais, C., Tel, L., Gourdine, J.L., 2010. Effect of temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using a nonlinear function. *Journal Animal Science.* 88: 3715–3724.
- Renaudeau, D.; Collin, A.; Yahav, S.; de Basilio, V.; Gourdine, J.L.; Collier, R.J. 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Journal Animal* 6:707–728
- Reverter, M., T. Lundh, H. L. Gonda, and J. E. Lindberg. 2000. Portal net appearance of amino acids in growing pigs fed a barley-based diet with inclusion of three different forage meals. *British Journal of Nutrition.* 84(4):483-94.
- Rhoads J. M., R. A. Argenzio, W. Chen, G. G. Gomez. 1995. Asparagine stimulates piglet intestinal Cl⁻ secretion by a mechanism requiring a submucosal glutamate receptor and nitric oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 274: 404–412
- Selye, H. 1976. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Canadian Medical Association Journal.* 115, 3–56.
- Sodhi, MS., E, Sanders-Bush. 2004. Serotonin and brain development: role in human develop mental diseases. *Brain Research Bulletin.* 59:111–174.
- Stahly, T. S., G. L. Cromwell. 1987. Optimal dietary lysine levels for pigs as influenced by the thermal environment. *Swine Res. Rep., Univ. of Kentucky, Lexington,* pp. 15–18.

- Stein, H. H., B. Sève, M. F. Fuller, P. J. Moughan, and C. F. M. de Lange. 2007. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *Journal Animal Science*. 85:172–180.
- Stoll B, D. G. Burrin, J. Henry, H. F. Yu, P. Jahoor, J. Reeds. 1999. Substrate oxidation by the portal drained viscera of fed piglets. *Animal Journal Physiology*. 277:168–175.
- St-Pierre, N.R., B. Cobanov y G. Shnitkey. 2013. Economic losses from heat stress by US Livestock Industries. *Journal Dairy Science* 86, E52-E77.
- 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 b⁰⁺ like system in chicken brush border jejunum. *Journal of Membrane Biology*. 180: 213–222.
- Troy, A., M. Bosch, E. Rick, B. Lee, E. Wagner, D. Seidlova-WuTTke, W. Wuttke, T. Scanalan, O. Ronneleiv and M, Kelly. 2010. Contribution of a membrane estrogen receptor to the estrogenic regulation of body temperature and energy homeostasis. *Journal of Endocrinology*. 151:4926-4937.
- Vaz, F. M., R. J. Wanders. 2002 Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical Journal*. 361:417–429
- Wang W. W., S. Qiao, D. F. Li. 2009. Amino acids and gut function. *Amino acids* 37:105-110.
- Wang X, Qiao SY, Yin YL, Yu LG, Wang ZY, Wu GY. 2007. A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young pigs. *Journal of Nutrition*. 137:1442–1446
- Wang, J.J., G. Wu, H.J. Zhou, and F.L. Wang. 2009. Emerging technologies for amino acid nutrition research in the post-genome era. *Amino Acids* 37:177–186.

- Wilson, T.E., G. Crandall. 2011. Randall, Effect of thermal stress on cardiac function. *Exercise Sport Science*. 39:12-17
- Wolp, RC, N.E.B. Rodrigues, M.G. Zangeronimo, V.S. Cantarelli, E.T. Fialho, R. Philomeno, R.R. Alvarenga, L.F. Rocha. 2012. Soybean oil and crude protein levels for growing pigs kept under heat stress conditions. *Livestock Science*. 147:148–153
- Wu G., Y.Z. Fang, S. Yang, J.R. Lupton, N.D. Turner. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*. 134(3):489–492
- Wu, G., SM Jr, Morris. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*. 336:1–17.
- Xia MS, Hu CH and Xu ZR 2005. Effects of copper bearing montmorillonite on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 118: 307-317
- Yan Y., Y. Zhao, H.Wang and M. Fan. 2006. Pathophysiology factors underlying heatstroke. *Medical Hypotheses*. 67: 609-617.
- Yao K., J. Fang, Y. L. Yin, Z. M. Feng, Z. R.Tang, G. Y. Wu. 2011. Tryptophan metabolism in animals: important roles in nutrition and health. *Frontiers Bioscience*. S3:286–297.
- Yen, J. T., B. J. Kerr, R. A. Easter, and A. M. Parkhurst. 2004. Difference in rates of net portal absorption between crystalline and protein-bound lysine and threonine in growing pigs fed once daily. *Journal Animal Science*. 82:1079–1090.
- Yin, Y. L., Z. R. Tang, Z. H. Sun, Z. Q. Liu, T .J. Li, R. L. Huang, Z. Ruan, Z. Deng, B. Gao, L. X. Chen, G. Wu and S. W. Kim. 2010. Effect of Galactomannan-oligosaccharides or Chitosan Supplementation on Cytoimmunity and Humoral Immunity in Early-weaned Piglets. *Asian Australasian Journal Animal Science*. 5:7213 - 731.

- Yin, Y. L., Z. Z. Zhang, J. Huang J and Y. L. Yin. 2010. Digestion of dietary Starch effects systemic circulation of amino acids in weaned pigs. *The British journal of nutrition*. 103(10):1404-12.
- Yu, J., P. Yin, F. Lui, G. Cheng, K. Gou, A. Lu, X. Zhu, W. Luan, and J. X. 2010. Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and gene expression study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 156(1):119-28
- Zhu, H., D. Pi, W. Leng, X. Wang, Ch. Hu, Y. Hou, J. Xiong, Ch. Wang, Q. Quin, Y. Liu. 2017. Asparagine preserves intestinal Barrier function from LPS-Induced injury and regulates CRF/CRFR signaling pathway. *Innate Immunity*. 23(6):546-556.