

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



**AMINOÁCIDOS LIBRES O EN PROTEÍNAS EN DIETAS  
PARA CERDOS EXPUESTOS A TEMPERATURA  
AMBIENTE ELEVADA**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN  
ANIMAL**

**PRESENTA:**

**TANIA GÓMEZ HERNÁNDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

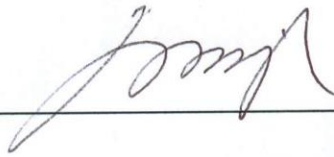
**Dr. MIGUEL CERVANTES RAMÍREZ**

La presente tesis titulada “**Aminoácidos libres o en proteínas en dietas para cerdos expuestos a temperatura ambiente elevada**”, realizada por C. Tania Gómez Hernández bajo la dirección del Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

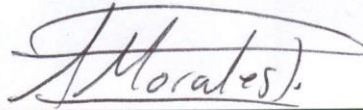
COMITÉ PARTICULAR

DIRECTOR



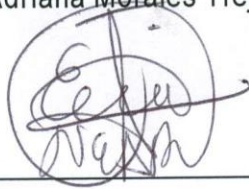
Dr. Miguel Cervantes Ramírez

SINODAL



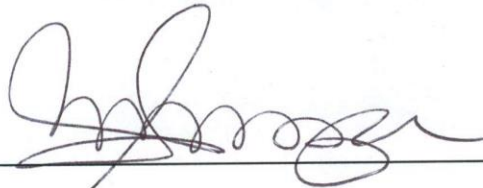
Dra. Adriana Morales Trejo

SINODAL



Dr. Ernesto Avelar Lozano

SINODAL



M.C. Salvador Espinoza Santana

POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE

Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México; Octubre 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Al Cuerpo Académico de Nutrición Animal (CANA) y todos sus integrantes.

## DEDICATORIA

Este trabajo de tesis se lo dedico a mi madre, Ale Hernández, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me ha brindado, dándome a cada instante los consejos e impulso para salir adelante. Con la mayor gratitud por todos tus esfuerzos desvelos y sacrificios, para que pudiera llegar a este momento tan importante de mi formación profesional. Guiando mis pasos y estar siempre en los momentos importantes, pero sobretodo en los momentos difíciles. Gracias por todo.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	3
ABSTRACT .....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. ANTECEDENTES .....	6
2.1 Aspectos generales de proteínas y aminoácidos .....	6
2.1.1 Aminoácidos.....	6
2.2 Transportadores de aminoácidos .....	9
2.2.1 Sistema y+LAT-1/4F2HC .....	10
2.2.2 Sistema B <sup>0</sup> AT-1 .....	11
2.3 Concepto de proteína ideal .....	13
2.4 Estrés por calor .....	14
2.5 Daño intestinal.....	15
III. JUSTIFICACIÓN .....	16
IV. HIPÓTESIS .....	17
V. OBJETIVOS .....	18
5.1 Objetivo general .....	18
5.1.1 Objetivos específicos .....	18
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
6.1 Localización.....	19

6.2 Diseño experimental.....	19
6.3 Dieta e ingredientes experimentales .....	19
6.4 Animales y procedimiento experimental.....	21
6.5 Obtención de muestras .....	21
6.5.1 Colecta de muestra sanguínea.....	21
6.5.2 Sacrificio.....	22
6.6.3 Procesamiento de muestras.....	23
6.6.3.1 Extracción de RNA .....	23
6.6.3.2 Transcripción inversa .....	23
6.6.3.3 PCR en tiempo real .....	24
VII. RESULTADOS.....	26
7.1 Parámetros productivos .....	26
7.2 Transportadores de aminoácidos .....	27
7.3. Concentración sérica de aminoácidos esenciales y no esenciales .....	27
VII. DISCUSIÓN .....	31
8.1 Comportamiento productivo .....	31
8.2 Transportadores de aminoácidos.....	32
8.3 Concentración sérica de aminoácidos.....	33
IX. CONCLUSIÓN .....	37
X. REFERENCIAS.....	38

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación de aminoácidos.....	9
<b>Cuadro 2.</b> Composición de las dietas experimentales.....	20
<b>Cuadro 3.</b> Oligonucleótidos para análisis de qPCR de ADNc de ARNm de transportadores de aminoácidos. ....	24
<b>Cuadro 4.</b> Parámetros productivos de cerdos consumiendo una dieta con proteína intacta o adicionada con AA libres.....	26
<b>Cuadro 5.</b> Expresión de transportadores B <sup>0</sup> y y+L en intestino delgado de cerdos alimentados con una dieta de proteína intacta o adicionada con aminoácidos libres....	27
<b>Cuadro 6.</b> Concentración sérica de aminoácidos esenciales a 2.0 h preprandial y 2,0 h postprandial en cerdos de estrés por calor.....	28
<b>Cuadro 7.</b> Concentración sérica de aminoácidos esenciales a 2.0 h preprandial y 2,0 h postprandial en cerdos de estrés por calor.....	29
<b>Cuadro 8.</b> Concentraciones sericas de los metabolitos de aminoacidos analizados 2 h preprandia y 2 h posprandial en cerdos en estres por calor consumiendo una dieta baja en proteina suplementada con AA libres. ....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura general de un aminoácido .....	6
<b>Figura 2.</b> Funciones fisiológica de los aminoácidos en mamíferos. ....	7
<b>Figura 3.</b> Vías de metabolismo de aminoácidos. ....	8
<b>Figura 4.</b> Árbol filogenético de los miembros de la familia SLC7. ....	10
<b>Figura 5.</b> Diagrama de árbol filogenético de miembros de la familia SLC6 en humanos. .....	11
<b>Figura 6.</b> Transportadores implicados en la absorción y reabsorción renal e intestinal de aminoácidos. ....	12
<b>Figura 7.</b> Obtención de muestras de intestino delgado.....	22



## **Lista de abreviaturas**

AA.- Aminoácidos

ADNc.- Ácido desoxirribonucleico complementario

Ala.- alanina

Arg.- Arginina

ARNm- Ácido ribonucleico mensajero

Asn.- Asparagina

Asp.- Aspartato

Cis.- Cisteína

CS.- Concentración sérica

dNTP.- Desoxiribonucleótidos trifosfatados

EC.- Estrés por calor

Fen.- Fenilalanina

GDP.- Ganancia diaria de peso

Gli.- Glicina

Gln.- Glutamina

Glu.- Glutamato

His.- Histidina

Ile.- Isoleucina

Leu.- Leucina

Lis.- Lisina

Met.- Metionina

pb.- Pares de bases

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa

Pro.- Prolina

qPCR.- Reacciona en cadena de la polimerasa cuantitativo

Ser.- Serina

SLC.- Transportadores de soluto

TA.- temperatura ambiente

TC.-Temperatura corporal

TGI.- Tracto gastrointestinal

Tir.- Tirosina

Tre.- Treonina

Trp.- Triptófano

Val.- Valina

## RESUMEN

El estrés por calor (EC), provoca daños en el intestino delgado que afectan la digestión, absorción y disponibilidad de nutrientes, primordialmente aminoácidos (AA). Se realizó un estudio para evaluar el efecto de una dieta baja en proteína y adicionada con AA libres, formulada bajo el concepto de proteína ideal, en el comportamiento productivo, expresión de transportadores de AA en intestino y concentración sérica de AA en cerdos en EC. El experimento de 21 días se llevó a cabo durante la época de verano en el valle de Mexicali. Se utilizaron 12 cerdos, divididos en dos tratamientos, un grupo recibió dieta típica alta en proteína (63.90% de trigo y 30% de pasta de soya), y el otro grupo recibió la dieta baja en proteína (91.82% de trigo y 4 % de pasta de soya) adicionada con AA libres. Los cerdos recibieron 1.2 kg/d de alimento dividido en dos comidas de 0.6 kg cada una, y el agua se ofreció a libre acceso. No se observó diferencia en la ganancia de peso de los cerdos alimentados con la dieta testigo o con la dieta adicionada con AA libres ( $P=0.589$ ), pero el rendimiento de la canal fue superior en los cerdos alimentados con la dieta con AA libres ( $P=0.010$ ). La expresión del transportador de AA neutros B<sup>0</sup> fue mayor en íleon ( $P=0.029$ ) pero no fue diferente en yeyuno ( $P=0.362$ ) de los cerdos que recibieron la dieta adicionada con AA libres. El sistema de transporte y+L mostró una tendencia a incrementar su expresión en yeyuno ( $P=0.068$ ) de cerdos que consumieron la dieta adicionada con AA libres, pero su expresión en íleon ( $P=0.624$ ) no fue diferente entre tratamientos. La concentración sérica (CS) de todos los AA esenciales fue mayor en la fase absorptiva (1.5 y 2.5 h post-prandial;  $P < 0.05$ ). Lis y Arg tuvieron los mayores incrementos en la fase post-prandial; por el contrario Ile, Leu y Val mostraron el menor incremento. La CS elevada de algunos AA en animales expuestos a estrés por calor, podría indicar su importancia frente a esta condición para mantener en lo posible la homeostasis del organismo.

## ABSTRACT

The heat stress (HS), causes damage to the small intestine affecting digestion, absorption and availability of nutrients, mainly of amino acids (AA). This study was conducted to evaluate the effect of a diet low in protein and added with free AA, under the concept of ideal protein, on the performance, expression of AA transporter in intestine and serum concentration (SC) of AA in pigs in HS. The experiment was conducted during 21 days on the summer in the Valley of Mexicali. Twelve pigs were divided in two treatments: one group received typical diet high in protein (63.90% wheat and 30% soybean meal), and the other group received the diet low in protein (91.82% wheat and 4% soybean meal), added with free AA. The pigs were feed with 1.2 kg/d divided into two meals of 0.6 kg each, the water was offered ad libitum. There were no differences in the weight gain of the pigs fed with the diet with 30% soybean meal or with diet added with AA free ( $P = 0.589$ ), but the carcass yield was higher in pigs fed the diet with free AA ( $P = 0.010$ ). The expression of the neutral AA transporter B0 was higher in the ileum ( $P = 0.029$ ) but was not different in the jejunum ( $P = 0.362$ ) of pigs that were feed with the diet added with free AA. The transport  $\gamma$ +L showed a tendency to increase its expression in the jejunum ( $P = 0.068$ ) of pigs fed with the diet added with free AA, but its expression in the ileum ( $P = 0.624$ ) did not differ between treatments. The serum concentration of all essential AA was higher in the absorptive phase (1.5 and 2.5 h post-prandial;  $P < 0.05$ ). The Lys and Arg had the largest increases during the post-prandial; in contrast, Ile, Leu and Val showed the lowest increase. The high CS of some AA in animals exposed to heat stress could indicate their importance against this condition to maintain the homeostasis of the organism.

## I. INTRODUCCIÓN

La exposición de animales a TA elevada les genera estrés EC principalmente durante el verano, condición que impacta de manera importante en su producción (Yu et al., 2010; Belhadj Slimen et al., 2015; Cui y Gu, 2015; Das et al., 2016). El EC provoca diversas modificaciones conductuales, fisiológicas y metabólicas (Horowitz et al., 2004; Bernabucci et al., 2010). Entre estas destaca el aumento en la temperatura corporal (TC), o rectal (Sanz Fernandez et al., 2014) y la reducción en la ingesta voluntaria de alimento (Aberle et al., 1974; Huynh et al., 2005; Zumbach et al., 2008; Renaudeau et al., 2010). Adicionalmente, el calor resultante de la digestión y metabolismo (Noblet et al., 1994) podría elevar aún más la TC (Christison y Johnson, 1972; Collier et al., 1982; Hahn, 1999; Patience et al., 2005). En respuesta, el animal tiende a elevar el gasto cardiaco hacia la periferia para lograr la disipación de calor (Wilson y Crandall, 2011). Esta redirección sanguínea genera una vasoconstricción (Lambert, 2009) en órganos internos principalmente en el tracto gastrointestinal, reduciendo el aporte adecuado de oxígeno y de nutrientes, el cual puede causar daños severos a las células intestinales, así como una considerable reducción en el tamaño y profundidad de vellosidades y cripta respectivamente (Yu et al., 2010; Cui y Gu, 2015).

La integridad intestinal es de suma importancia debido a que el transporte de los AA y la mayoría de los nutrientes se lleva a cabo en las células epiteliales del intestino delgado. Este estudio se realizó para analizar el comportamiento productivo, expresión de dos genes que codifican para transportadores de AA, y la CS de AA durante la fase de absorción y de post-absorción en cerdos expuestos a EC, alimentados con dietas cuyos AA se proporcionaron en forma de proteína intacta o en forma libre.

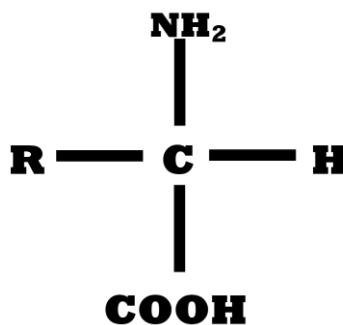
## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Aspectos generales de proteínas y aminoácidos

Las proteínas son constituyentes orgánicos, formadas a partir de AA que se unen entre sí mediante enlaces covalentes. La codificación de las proteínas es diversa debido a que todas cuentan con un ordenamiento y número de AA distinta (Alberts et al., 2002) determinada por la información codificada en los genes; característica que le confiere diferente valor nutricional a cada una. Los AA que constituyen a las proteínas son esenciales para los seres vivos, necesarios para la estructura y fisiología celular (Laguna y Piña 2002), contribuyendo de manera importante en el adecuado desarrollo de los animales jóvenes

#### 2.1.1 Aminoácidos

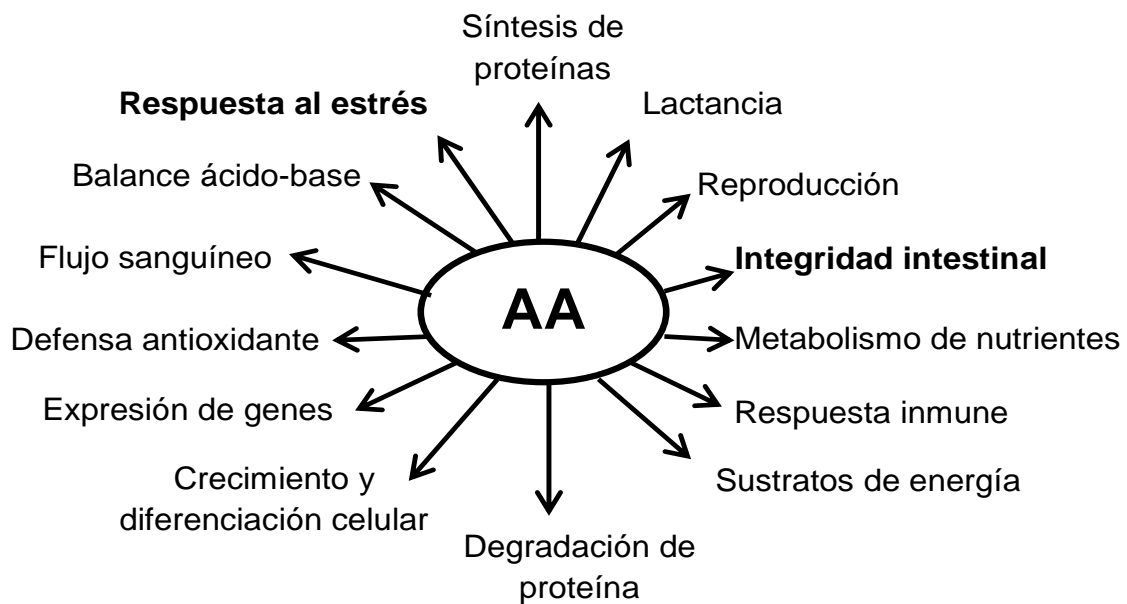
Aun cuando se conoce que existen más de 200 AA, solamente 20 de ellos pueden ser encontrados en las proteínas (McDonald et al., 1993), su estructura (Figura 1) contiene un grupo nitrogenado básico, que generalmente es un grupo amino, y un grupo carboxílico ácido (Dickson, 2000; Peña et al., 2004, Rezaei et al., 2013). La existencia de ambos grupos hace que estos compuestos orgánicos posean propiedades tanto acidas como básicas.



**Figura 1.** Estructura general de un aminoácido

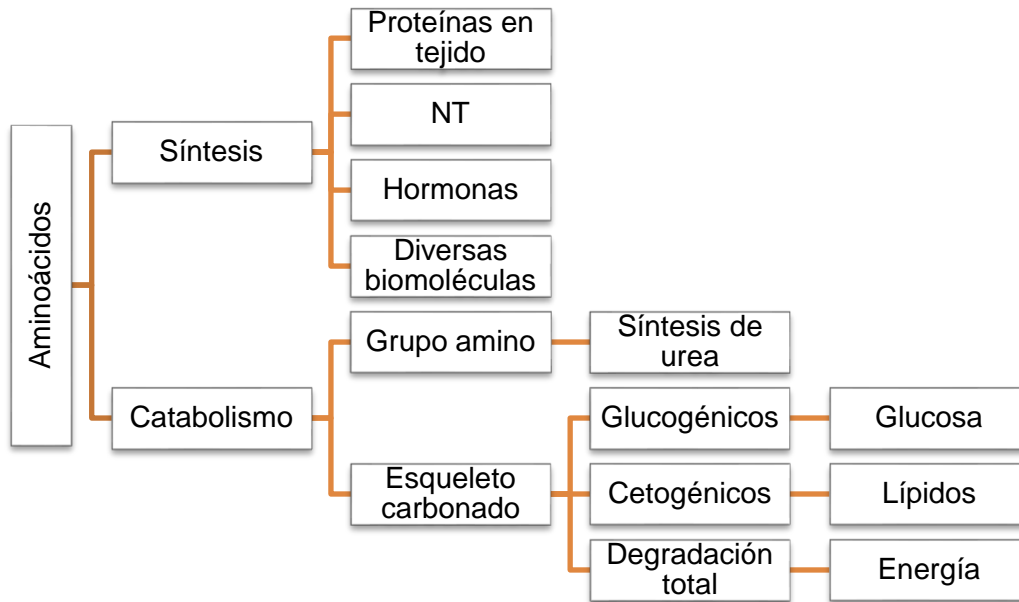
(McDonald, 1993)

De los AA que podemos encontrar en las proteínas la mayoría son del tipo  $\alpha$  (Voet, 2006; Church et al., 2007) y estos cumplen importantes funciones; regulan la expresión génica (Wang et al., 2012; Wu et al., 2013), son reguladores antioxidantes, neurotransmisores (Parpura y Verkhratsky, 2013; Kiriya y Nochi, 2016), precursores de diversas biomoléculas que incluyen a las coenzimas nucleotídicas, hormonas (Wu, 2009; Figura 2) e incluso intermediarios metabólicos como piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato, oxalacetato, y por lo tanto precursores de ácidos grasos, cuerpos cetónicos y glucosa (Voet, 2006). Debido a que no existe un tejido especializado para el almacenamiento de AA como moléculas libres, para su futuro empleo o excreción, el exceso de estos ingresa a una ruta de degradación (Figura 3).



**Figura 2.** Funciones fisiológicas de los aminoácidos en mamíferos.

Adaptado (Wu, 2010)



**Figura 3.** Vías de metabolismo de aminoácidos.

(Garrido et al., 2001)

Existen diversas maneras de clasificación para los AA (Cuadro 1), una de estas es de acuerdo a su esencialidad nutricional (Rezaei et al., 2013). Los AA no esenciales (AANE) son aquellos que el animal puede sintetizar en las cantidades requeridas por el organismo, no necesariamente se requiere ser adicionados en la ración alimenticia, cumpliendo con las exigencias para un adecuado desarrollo (Wu et al., 2013). Aquellos AA que el animal no tiene la capacidad metabólica para sintetizarlos, y son necesarios para el mantenimiento, crecimiento, desarrollo y reproducción idóneos reciben el nombre de AA esenciales o indispensables (AAE; Hou et al., 2015), y deben ser proporcionados en la ración alimenticia. Aun cuando algunos AA han sido clasificados como no esenciales, estos pueden ser considerados condicionalmente esenciales, debido a que en diversas etapas de la vida (periodo neonatal) o situaciones como el estrés, su utilización supera su tasa de producción (Rezaei et al., 2013).



## Cuadro 1. Clasificación de aminoácidos

Clasificación	Aminoácido					Referencia
<b>Esenciales</b>	Arg*	Ile	Lis	Fen	Trp	(Mertz et al., 1952; Wu, 2014; Van Milgen y Dourmad, 2015)
	His	Leu	Met	Tre	Val	
<b>No esenciales</b>	Ala	Asp	Gli	Gln	Ser	(Mahan y Shields, 1950)
	Asn	Cis	Glu	Pro	Tir	

\* En las células mamíferas Arginina es sintetizada de manera insuficiente, para cubrir las necesidades de crecimiento y desarrollo adecuado del cuerpo. Por ello es considerado un aminoácido esencial.

Adaptado (Rezaei et al., 2013)

## 2.2 Transportadores de aminoácidos

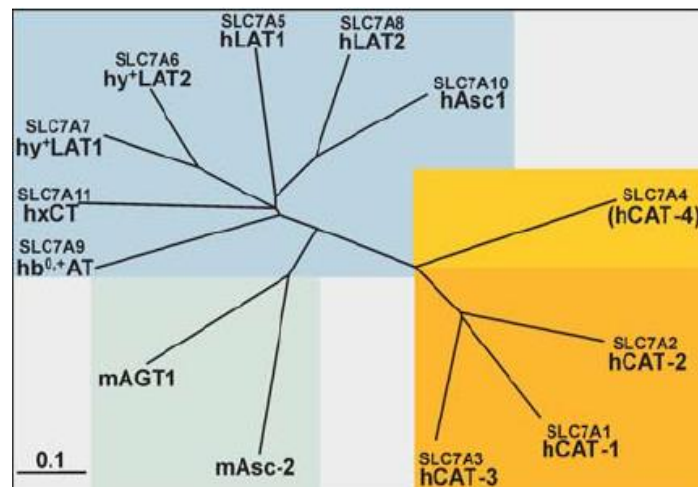
Aproximadamente el 95 % de absorción de proteínas en el intestino, se logra gracias al trabajo complejo que realizan en equipo proteasas, peptidasas (Hou et al., 2016) y algunos transportadores (Matthews, 1972; Kim et al., 2004; Bröer, 2008b). Los AA necesarios para la síntesis de proteínas son absorbidos y reabsorbidos por transportadores de diferentes familias que se expresan en intestino y riñón (Lin et al., 2015). Posteriormente los AA son liberados al torrente sanguíneo y distribuidos a diversos tejidos para generar nuevas proteínas, ser precursores de biomoléculas e incluso para generación de energía (Bröer, 2008b; Liao et al., 2009). Después de su distribución a diversos órganos incluyendo el riñón, un gran porcentaje los AA libres son reabsorbidos por el glomérulo en el túbulo proximal (Christensen, 1990; Kanai et al., 2000; Danilczyk et al., 2006; Lin et al., 2015) evitando pérdidas de metabolitos.

En el intestino delgado la captación y flujo de diversos compuestos como azúcares, AA, nucleótidos e incluso fármacos es llevada a cabo por transportadores (Deng et al., 2015; Rives et al., 2017) ampliamente selectivos, garantizando el suministro regulado de los sustratos requeridos. Los transportadores son proteínas que se encuentran ligadas a la membrana y que median la translocación de un sustrato a través de las membranas celulares (Oxender y Christensen, 1963; Hediger et al., 2004; Bröer, 2008a; Fotiadis et al., 2013)

### 2.2.1 Sistema y+LAT-1/4F2HC

Los transportadores de soluto (SLC) son una familia con más de 300 proteínas que se encuentran ligadas a la membrana, y desempeñan papeles importantes en diversos procesos fisiológicos, como la captación celular de nutrientes (Lin et al., 2015). Estos transportadores presentan una amplia interacción con diversos sustratos y varían en especificidad, existen algunos que son altamente selectivos y solo se relacionan con un grupo muy limitado de sustratos, como sucede en la familia de transportadores SLC7 (Fotiadis et al., 2013; Lin et al., 2015). Esta familia esta fraccionada en dos sub familias (Figura 4):

- Familia de transportadores de AA catiónicos (CAT, SLC7-4)
- Los transportadores tipo L de la familia LAT (Kanai et al., 2000) con transportadores asociados a glicoproteínas ( SLC7A5-11), de membrana tipo II tales como la cadena 4F2HC (Bröer, 2008a), formando un complejo heterodimérico (Kanai et al., 2000; Verrey et al., 2004; Fotiadis et al., 2013) a través de un enlace disulfuro (Torrents et al., 1998).



**Figura 4.** Árbol filogenético de los miembros de la familia SLC7.

(Verrey et al., 2004).

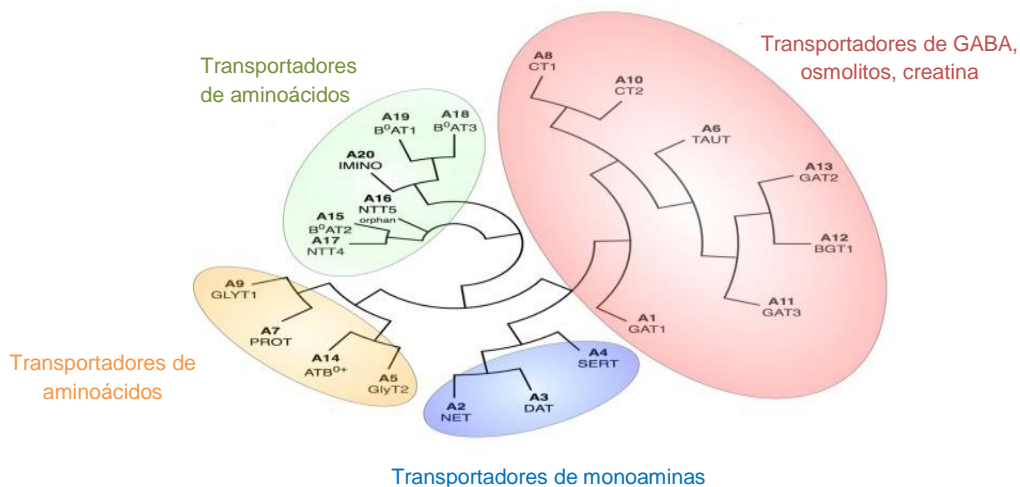
Se ha demostrado que este transportador heteromérico, dependiente de sodio (Kanai et al., 2000) media la captación de AA neutros como co-sustrato (Fotiadis et al., 2013), realizando un intercambio de AA neutros (AA<sup>0</sup>) por AA catiónicos (AA<sup>+</sup>) intracelulares. Este sistema de transporte permite el flujo de salida de AA<sup>+</sup> contra el potencial de membrana en el dominio basolateral de las células epiteliales. El heterodímero 4F2hc-y + LAT2 media el sistema y + L en muchos otros tipos de células (Palacín et al., 2005).

### 2.2.2 Sistema B<sup>0</sup>AT-1

La familia de transporte SLC6 son co-transportadores activos secundarios que utilizan gradiente quimiosmótico de Na<sup>+</sup>. Basados en el sustrato que traslocan son divididos en 4 subgrupos (Pramod et al., 2013) que coinciden con el árbol filogenético (Figura 5):

- Transportadores de neurotransmisores
- Transportadores de AA
- Transportadores de osmolitos
- Transportadores de creatina

Esta familia incluye transportadores de AA neutros y catiónicos expresados en diversos órganos. Y su función principal es mediar el transporte rápido del sustrato a través de las membranas celulares (Bröer and Palacín, 2011) en contra de sus gradientes de concentración.

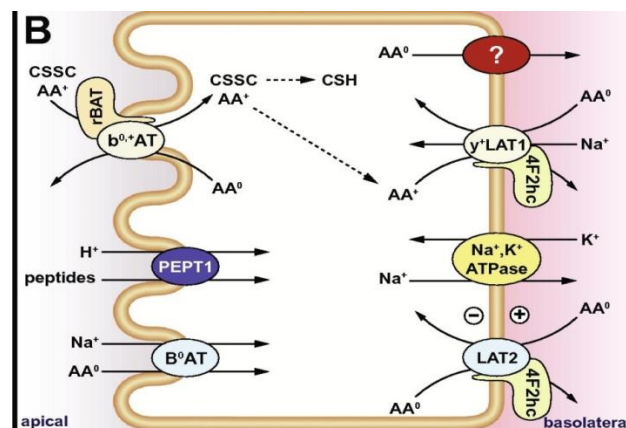


**Figura 5.** Diagrama de árbol filogenético de miembros de la familia SLC6 en humanos.

(Pramod et al., 2013)

La proteína B<sup>0</sup> AT1 (SLC6A19) está formada por 634 AA (Kleta et al., 2004; Bröer, 2008b), se ha detectado su expresión especialmente en riñón e intestino delgado (Seow et al., 2004; Camargo et al., 2009; Figura 6), y una expresión mínima en páncreas en humanos (Kleta et al., 2004). Principalmente en la membrana apical de las células epiteliales (Bröer et al., 2004; Seow et al., 2004; O'Mara et al., 2006), B<sup>0</sup> AT1 es un sistema dependiente de sodio. Camargo et al. (2005) reportaron que B<sup>0</sup> AT1 en ratón media el transporte de una amplia gama de AA neutros, y alifáticos (Bröer, 2008a), no así de sustratos químicamente similares, transportados por otros miembros de la familia SLC6A. El sistema B<sup>0</sup> AT1 presenta una amplia capacidad de transporte, pero debido a que muchos AA compiten por este sistema existe una mayor posibilidad de que algunos sean absorbidos de manera más eficiente que otros (Bröer, 2008a).

La figura 6 muestra la distribución de los transportadores heteroméricos en la membrana apical o basolateral de células epiteliales renales e intestinales. La alta concentración de AA<sup>0</sup> debido al transporte apical (B<sup>0</sup>AT1) y basolateral (y<sup>+</sup>LAT1-4F2hc), promueve la reabsorción activa de AA<sup>+</sup> y cistina (CscC), junto con el potencial de membrana y la reducción de CscC a cisteína (CSH; Fotiadis et al., 2013).



**Figura 6.** Transportadores implicados en la absorción y reabsorción renal e intestinal de aminoácidos.

(Fotiadis et al., 2013)

### 2.3 Concepto de proteína ideal

La producción porcina es realizada principalmente en zonas donde la TA durante el verano es superior a la temperatura corporal de los animales, aunado a esto el desequilibrio entre la producción de calor metabólico dentro del cuerpo del animal y su disipación en el entorno propicia estrés térmico (Das et al., 2016) provocando una reducción en el consumo de alimento (Le Bellego et al., 2002), esto se traduce en una menor disponibilidad de nutrientes para un adecuado desarrollo y producción. Para compensar este inadecuado aporte de nutrientes debe hacerse uso de técnicas nutricionales, modificando la proporción de los componentes en la dieta (Das et al., 2016), y haciendo hincapié en el contenido de proteína para optimizar su utilización. Por ejemplo, se propone balancear las dietas bajo el concepto de “proteína ideal”. Bajo ese concepto los requerimientos de AA de los animales se cubren al 100% en la dieta, ya sean aportándolos en forma libre o como parte de las proteínas, sin excedente de ninguno de ellos, maximizando así la retención proteica con una mínima excreción de nitrógeno (Lewis, 2001).

Regularmente las dietas típicas (trigo-pasta de soya) son formuladas para cubrir el 100% del primer AA limitante en la dieta para cerdos, esto genera que haya excesos en otros AA esenciales. Algunos estudios han mostrado que la digestión de proteínas incrementa la producción de calor en el animal (Le Bellego et al., 2001) si es comparada con el producido por lípidos y carbohidratos (Stahly y Cromwell, 1986). Así que tomando en cuenta que las dietas bajas en proteína producen menor cantidad de calor, el uso de estas podría ayudar a reducir los estragos ocasionados por el estrés por calor y la disminución de consumo voluntario de alimento (Quiniou et al., 2000). Existe evidencia de que el porcentaje de proteína en la dieta puede reducirse significativamente al ser suplementado con AA libres (Morales et al., 2015), lo anterior es debido a que las proteínas que forman parte de la dieta, deben ser digeridas para permitir la liberación de los AA que la componen. A diferencia de aquellos, los AA adicionados en forma libre, aumentarían su disponibilidad, la abundancia de sus transportadores y absorción incluso desde el inicio del intestino delgado.

## 2.4 Estrés por calor

Elevada temperatura ambiental y circunstancias extremas, consecuencias del calentamiento global exponen a los animales de producción a condiciones que les genera estrés, principalmente EC, el exceso en la temperatura de confort (16 - 24°C; Coffey et al., 1995) desencadena diversos cambios fisiológicos, metabólicos, inmunológicos, incluso conductuales (Horowitz et al., 2004). Principalmente reducción en el consumo de alimento (Aberle et al., 1974; Huynh et al., 2005; Zumbach et al., 2008; Renaudeau et al, 2010), ya que el calor resultante de la digestión y metabolismo (Noblet et al., 1994) podría incrementar el calor y por tanto el estrés. El organismo también lleva a cabo un mecanismo compensatorio con la finalidad de minimizar los daños celulares y a órganos, este sistema se manifiestan principalmente con, taquipnea, taquicardia (Christison y Johnson, 1972; Collier et al., 1982; Hanh et al., 1999; Patience et al, 2005) y un aumento en el gasto cardiaco con el propósito de perfundir la vasculatura intradérmica y eliminar exceso de calor (Wilson y Crandall, 2011). Esta redirección de la sangre hacia la periferia corporal, provoca una vasoconstricción, predisponiendo todo el tracto gastrointestinal a daño isquémico, comprometiendo la función e integridad intestinal. Yu et al. (2010) demostraron que animales expuestos a EC presentan una marcada reducción en la altura de las vellosidades intestinales y profundidad de la cripta; aumento en la síntesis de proteínas de choque térmico (Sonna et al, 2002), alteraciones en la función de la membrana celular, la proliferación celular, y reducción en la abundancia de transportadores de nutrientes en el intestino (Sonna et al, 2002). Adicionalmente se puede observar un aumento de permeabilidad intestinal, lo que permite que metabolitos, toxinas, alimento no digerido y bacterias, escapen hacia el torrente sanguíneo. Debido a todos estos cambios el intestino llega a un estado hipóxico (Yan et al., 2006; Qi et al., 2011), ácido y puede experimentar estrés oxidativo (Gisolfi, 2000; Hall et al., 2001). Todas estas alteraciones en el epitelio intestinal influyen negativamente sobre la digestión y absorción de nutrientes alterando el rendimiento de animales (Liu et al., 2009) en crecimiento, ganancia diaria de peso, reproducción y salud (Yu et al., 2010).

## 2.5 Daño intestinal

Mantener la integridad de las membranas celulares es fundamental para proteger las actividades metabólicas. La regulación del transporte a través de membranas de productos químicos esenciales, incluyendo agua, nutrientes, hormonas y muchos fármacos, es por lo tanto clave para mantener la homeostasis celular y los procesos fisiológicos. El mecanismo vital para absorber nutrientes y líquidos en el organismo es llevado a cabo por el tracto gastrointestinal (Cui y Gu, 2015; Pearce et al., 2015), la mucosidad que se encuentra en este, provee una barrera contra las bacterias, toxinas (Hirata et al., 2007; Bajka et al., 2015) y sustancias nocivas en general. Diversos estudios han demostrado los efectos negativos del EC en la función e integridad intestinal (Cui y Gu, 2015). Yu et al. (2010) demostraron que después de exponer a cerdos a 40°C durante 5 horas por diez días (estrés por calor crónico), estos denotaron daños significativos en duodeno y yeyuno a partir de tres días en tratamiento. Lo anterior se debe principalmente a que los animales en EC redireccionan el flujo sanguíneo hacia la periferia con el fin de eliminar calor, generando una vasoconstricción en los órganos internos (Lambert, 2009), principalmente en el tracto gastrointestinal, reduciendo el aporte adecuado de oxígeno y de nutrientes, y provocando severos daños a las células intestinales (Hall et al., 2001). Esta respuesta celular compleja que desencadena el organismo ante el EC altera significativamente la expresión genética (Sonna et al., 2002). En consecuencia, cerdos expuestos a EC podrían afectar el epitelio intestinal e influir de manera negativa en el rendimiento y bienestar animal (Marai et al., 2007; Liu et al., 2009).

### III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe una alta demanda en la producción animal, consumidores exigentes en cuanto al precio y calidad de carne, aunado a la cada vez más notable escases de los recursos naturales. Estas situaciones sugieren buscar nuevas técnicas y alternativas que permitan un desarrollo apto de la producción animal, la cual ha sido afectada por diversos factores como el EC, que padecen los animales a consecuencia de las altas temperaturas derivadas del cambio climático y calentamiento global. En general, estos son retos importantes cuando la producción animal se lleva a cabo en lugares muy cálidos o durante la época de verano, cuando en los animales se sobrepasan los mecanismos para lograr la homeostasis, se afecta el consumo voluntario de alimento, y se alteran las características del epitelio intestinal. Se han realizado diversos estudios para comprender el efecto del EC, los cuales, en su mayoría, han sido efectuados en condiciones artificiales, por periodos cortos y sin exceder los 35°C. En este trabajo se propone evaluar un sistema de alimentación basado en la elaboración de dietas formuladas bajo el concepto de proteína ideal para reducir la producción de calor corporal y, en consecuencia, mejorar la digestión y absorción de AA, mejorando así la productividad de animales en situación de EC, utilizando las condiciones climatológicas que se dan durante el verano en el valle de Mexicali donde la TA puede alcanzar aproximadamente 45°C.



#### **IV. HIPÓTESIS**

La incorporación de AA libres en una dieta baja en proteína puede ayudar a mejorar la disponibilidad de AA y comportamiento productivo en cerdos en crecimiento expuestos a estrés por calor.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de alimentar cerdos en estrés por calor con una dieta baja en proteína adicionada con AA libres sobre el comportamiento productivo, la absorción y disponibilidad de AA de cerdos expuestos a temperatura ambiental elevada.

#### 5.1.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la forma en que se incorporan AA a la dieta (proteína intacta o AA libres) en el comportamiento productivo de cerdos en crecimiento.
- Determinar si AA libres en la dieta estimulan la abundancia de transportadores de AA en intestino delgado de cerdos aumentando así su capacidad de absorción intestinal.
- Determinar si la incorporación de AA libres en la dieta ayuda a aumentar la disponibilidad de AA en cerdos expuestos a condiciones de temperatura ambiental elevada.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Localización

La fase experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Metabolismo y Fisiología de Cerdos, y el análisis de muestras en el Laboratorio de Nutrigenómica del Instituto de Ciencias Agrícolas, perteneciente a la Universidad Autónoma de Baja California, con dirección en Carretera a Delta s/n C.P. 21705 Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México.

### 6.2 Diseño experimental

Para determinar el efecto tiene la forma en que se incorporan AA a la dieta sobre el comportamiento productivo, expresión de transportadores de AA y CS de AA de cerdos en EC, se elaboraron 2 dietas cubriendo los requerimiento de los animales. Se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar, para el cual los cerdos fueron bloqueados de acuerdo a su peso vivo inicial, sexo y camada, continuando con una distribución aleatoria a uno de dos tratamientos T1 (dieta con proteína intacta) y T2 (dieta adicionada con AA libres) con seis repeticiones cada uno. Consumiendo una de las dos dietas por 21 días.

### 6.3 Dieta e ingredientes experimentales

Se utilizaron dos dietas experimentales formuladas con trigo y pasta de soya, en la primer dieta los AA estaban únicamente en forma de proteína (proteína intacta), mientras que la segunda fue formulada con un nivel menor de proteína pero adicionada con AA libres, bajo en concepto de proteína ideal para cubrir el requerimiento de los cerdos (NRC, 2012). La dieta de proteína intacta contenía 63.90% de trigo y 30% de pasta de soya. La dieta adicionada con AA contenía 91.82% de trigo y 4 % de pasta de soya, los AA adicionados fueron L-Lys. HCl, 0.78; Treo, 0.26; DL- Met, 0.13, Trp, 0.05; Fen, 0.03; Leu, 0.13, Ile, 0.06; His, 0.03; Val, 0.11; AA libres cumpliendo con los

requisitos SID de NRC (2012; Cuadro 2). La diferencia entre ambas dietas es la forma en la que se encuentra adicionados los AA (unidos a proteína o como AA libres). Ambas dietas contenían una premezcla de vitaminas y minerales para cubrir el requerimiento de acuerdo con NRC (2012).

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

Ingredientes	AA Libres (14%Proteína )	Proteína intacta (22% Proteína)
Trigo molido	91.82	63.90
Soya	4.00	30.30
L- Lis- HCL	0.78	
L- Treonina	0.26	
DL- Metionina	0.13	
L- Triptofano	0.05	
L- Fenilalanina	0.03	
L- Leucina	0.13	
L- Isoleucina	0.06	
L- Histidina	0.03	
L-Valina	0.11	
Carbonato de calcio	1.40	1.25
Ortofosfato	0.65	1.00
Sal ionizada	0.35	0.35
Premix vitaminas y minerales	0.20	0.20
Aceite de canola		3.00
	100	100

## 6.4 Animales y procedimiento experimental

Se utilizaron 12 cerdos (siete machos castrados y cinco hembras) cruce de Landrace x Duroc x Yorkshire, con un promedio de  $47.4 \pm 5$  kilogramos de peso vivo provenientes de la granja experimental del instituto de Ciencias Agrícolas UABC. Los cerdos fueron asignados a uno de dos tratamientos (dieta con proteína intacta, o dieta adicionada con AA libres). A cada cerdo se le ofrecieron 600 gramos del alimento correspondiente a las 0700 y a las 1900 horas, durante un período comprendido entre 07 al 27 de julio de 2016. Los cerdos previamente pesados e identificados fueron alojados en corraletas individuales dentro de una sala sin control alguno de la temperatura ambiental, expuestos a estrés por calor. En promedio la temperatura ambiente mínima y máxima fue de 24.5 y 42.6° C respectivamente, y la humedad relativa fluctuó entre 12.8 y 77.9 %; ambos parámetros se determinaron mediante higrómetros (Thermotracker Inc.) instalado dentro la habitación, programados para grabar estas variables cada hora. Cada corraleta estaba equipada con un comedero previamente pesado, tipo tolva y bebedero de chupón, los animales tuvieron acceso permanentemente a agua. Se registró diariamente el alimento servido en cada corral así como el alimento desperdiciado o rechazado; el peso final de los cerdos se registró el día 21 del experimento a las 0800 horas antes de realizar el sacrificio utilizando una báscula electrónica.

## 6.5 Obtención de muestras

### 6.5.1 Colecta de muestra sanguínea

La obtención de muestras sanguínea solo se realizó para aquellos animales que consumieron la dieta con el nivel bajo de proteína, para determinar la disponibilidad sérica de AA en cerdos expuestos a condiciones de EC en diferentes etapas de absorción; para ello se obtuvieron muestras sanguíneas durante la fase de absorción (1.5 y 2.5 h post-prandial) en los días 8 y 9; y el día 11 durante la fase post-absorción (10 h post-prandial). Se colectaron aproximadamente 10 ml de sangre por punción en la vena yugular de cada cerdo.

Inmediatamente después de la colecta, las muestras fueron centrifugadas a 1500 x g a 4°C por 10 min para separar el suero, que posteriormente fue liofilizado y almacenado a -20 °C para su posterior análisis y determinación la concentración de AA libres. El contenido de AA en suero se determinó en los laboratorios de Evonik Industries (Hanau-Wolfgang, Germany) mediante HPLC.

### 6.5.2 Sacrificio

El día 21 del experimento se realizó el sacrificio de los cerdos dicha actividad se llevó a cabo en el taller de carnes perteneciente al Instituto de Ciencias Agrícolas. Después de un ayuno de 12 horas, los cerdos fueron alimentados a las 0700 horas con la misma cantidad de alimento y dieta correspondiente, el sacrificio inició a las 0930 horas, dos horas y media después de su último consumo de alimento. Se realizó alternando un cerdo por tratamiento, previamente insensibilizados mediante descarga eléctrica controlada y desangrado. Durante este procedimiento se registró el peso de la canal sin cabeza. Se registró el tiempo requerido para la obtención de las muestras de cada cerdo, mismo que no excedió los 15 min (en promedio 12. 62 minutos).

Posterior a la insensibilización y desangrado, la canal fue colocada en una mesa para la obtención de cada tejido. Se colectaron muestras de intestino (yeyuno e íleon) mediante raspado a la mucosa con un portaobjetos, las muestras se colocaron dentro de tubos de 2 ml previamente identificados y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -82 °C.



**Figura 7.** Obtención de muestras de intestino delgado.

### 6.6.3 Procesamiento de muestras

#### 6.6.3.1 Extracción de RNA

Cada una de las muestras de yeyuno e íleon fueron colocadas en un mortero de porcelana frío y pulverizadas en presencia de nitrógeno líquido. Se recuperaron 50 mg de muestra en un tubo de 2 ml y se adicionaron 1000 µl de TRIzol reagent antes de centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm a 4 °C. Se recuperó la fase líquida en un tubo nuevo y se adicionaron 200 µl de cloroformo, la muestra se agitó de manera vigorosa e incubó en hielo por 2 minutos, posteriormente se centrifugó por 15 minutos a la misma velocidad y temperatura. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se precipitó el ARN con 500 µl de isopropanol e incubó en hielo por 10 minutos, nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 4 °C. Al término se decantó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1000 µl de etanol al 100% para posteriormente centrifugar a 8500 rpm, 5 min a 4 °C. Se retiró la fase líquida y la pastilla de ARN se dejó secar 10 minutos a temperatura ambiente. El ARN fue resuspendido en 30 µl de agua tratada con DEPC (Méndez et al., 2011).

Para determinar la calidad del ARN total obtenido se utiliza un gel de agarosa al 1% y se realizó electroforesis. Las muestras fueron almacenadas a -82 °C hasta continuar con el procedimiento.

#### 6.6.3.2 Transcripción inversa

La síntesis de cDNA se inició con un tratamiento de DNasa de acuerdo con lo siguiente: en un tubo de 700 µl, se colocaron 6 µl de buffer 5x, 18.25 µl de agua DEPC, 5 µl RNA (900 ng/µl) y 0.75 µl de DNasa (Thermo-Scientific); esta reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, y posteriormente 5 min a 70°C para detener esta reacción. Se añade 1 µl de Random Primers (10 µM) y 1µl de dNTPS (10 µM de cada uno), esta reacción se incubó 5 min a temperatura ambiente y posterior en hielo. Se agrega 2 µl de buffer 5x, 3 µl de agua, 1 µl de inhibidor de RNasa (Ribolock, Thermo-Scientific) y la reacción se incubó 2 min a 42°C. Se adiciona 1µl de enzima transcriptasa inversa (200 U / µl; Revert-aid,

Thermo-Scientific), la reacción se incubó a 42 °C durante 50 min, e inactiva por 15 min a 70 °C. El producto de la reacción y se almacenó a -20°C.

### 6.6.3.3 PCR en tiempo real

Se realizó PCR en tiempo final para estandarizar las condiciones de amplificación y determinar la especificidad de cada oligonucleótido de acuerdo con las secuencias mostradas en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Oligonucleótidos para análisis de qPCR de ADNc de ARNm de transportadores de aminoácidos.

ARNm	Secuencia	Producto (pb)	Número de acceso
B <sup>0</sup> (SLC6A19)	S: 5'TCTGTCCACAACAACACTGCGAG3' A: 5'CAGCGAAGTTCTCCTGCGTC3'	210	DQ231579.1
ARNr18S	S: 5'-ATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3' A:5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC-3'	302	AY265350
y +L (SLC7A7)	S: 5'TCAAGTGGGGAACCCTGGTA3 A: 5'ATGGAGAGGGGCAGATTCCT3'	259	NM_001110421.1

S: Sentido; A: Antisentido

Se estimó la expresión del mRNA de los transportadores de aminoácidos, B<sup>0</sup> (SLC 6A19), y +L (SLC7A7) mediante ensayos de PCR cuantitativo (qPCR), utilizando Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Corp., Glen Burnie, MD, USA) en un termociclador de tiempo real CFX96 Touch versión 3.0 (Bio-Rad), para la calibración del programa se utilizó el gen constitutivo ARNr 18S (GenBank AY265350).

Cada reacción preparada para el qPCR contenía 12.5 µl de 2x SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 9.5 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl de oligo mix (3 mM de cada uno), 1 µl de cDNA (50 ng/µl) para un volumen total de 25 µl.



Las reacciones se realizaron por duplicado para el calibrador y el gen del transportador correspondiente, las condiciones de amplificación y cuantificación fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial 95 °C durante 10 minutos
- Amplificación en 45 ciclos
  - Desnaturalización a 95 °C durante 30 s
  - Alineación a 56 °C durante 30 s
  - Extensión a 72 °C durante 45 s
  - Lectura de fluorescencia al final de cada ciclo
- Determinación de la curva de desnaturalización (56°C a 96 °C) con lectura de fluorescencia en cada incremento de 0.5 °C.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Parámetros productivos

Los cerdos permanecieron sanos durante todo el experimento, consumiendo el alimento ofrecido diariamente, independientemente del tipo de dieta y la TA. En el Cuadro 4 se muestra los resultados de comportamiento de los cerdos que fueron alimentados con una dieta trigo-pasta de soya, alta en proteína conteniendo únicamente AA ligados a proteína intacta o baja en proteína suplementada con AA libres. El consumo de alimento se restringió a 1.200 kg por día para todos los cerdos. No hubo diferencias en la GDP, eficiencia alimenticia (EA) y peso de la canal ( $P>0.05$ ) No obstante aquellos animales alimentados con la dieta suplementada con AA libres mostraron mayor porcentaje de rendimiento de la canal ( $P<0.05$ ) con respecto a los alimentados con proteína intacta en la dieta.

**Cuadro 4.** Parámetros productivos de cerdos consumiendo una dieta con proteína intacta o adicionada con AA libres

Parámetro	Tratamiento		SEM	P =
	ECAP	ECAA		
Peso inicial, kg	47.3	47.5		
Ganancia diaria de peso, g/d	540	519	25	0.589
Consumo diario				
Consumo, kg/d	1.185	1.192	3.93	0.300
Lis, g/d	11.61	11.67	0.03	0.300
Tre, g/d	8.06	8.07	0.03	0.300
Met, g/d	3.32	3.34	0.01	0.300
EA	0.456	0.436	0.02	0.540
Peso de la canal, kg	33.5	35.5	0.9	0.178
Rendimiento de la canal, %	57.1	60.6	0.6	0.010

## 7.2 Transportadores de aminoácidos

El Cuadro 5 muestra la expresión relativa de los mRNA para los transportadores B<sup>0</sup> y y+L en íleon y yeyuno de cerdos expuestos a EC, que fueron alimentados con las dietas de proteína intacta o adicionada con AA. La expresión de B<sup>0</sup> fue mayor en íleon (P=0.029) pero no fue diferente en yeyuno (P=0.3628). Se observó una tendencia a incrementar (P=0.068) la expresión del sistema de transporte y+L en yeyuno de los cerdos que consumieron la dieta adicionada con AA libres con respecto a aquellos que consumieron la dieta con proteína intacta, pero la expresión en íleon (P=0.6244) no fue diferente entre tratamientos.

**Cuadro 5.** Expresión de transportadores B<sup>0</sup> y y+L en intestino delgado de cerdos alimentados con una dieta de proteína intacta o adicionada con aminoácidos libres

	Tejido	PI	AAL	EEM	P=
B <sup>0</sup>	Yeyuno	10.360	11.138	0.5735	0.3628
	Íleon	10.970	12.584	0.4394	0.0290
Y <sup>+</sup> L	Yeyuno	8.577	10.580	0.6938	0.0684
	Íleon	11.738	12.003	0.3710	0.6244

PI= Proteína intacta; AAL= Aminoácidos libres

## 7.3. Concentración sérica de aminoácidos esenciales y no esenciales

Debido a que la CS de AA es un indicador de la absorción, utilización y disponibilidad de estos; en el Cuadro 6 se muestra el análisis de la CS de AAE, AANE (Cuadro 7) y metabolitos (Cuadro 8) en los animales alimentados con la dieta baja en proteína adicionada con AA libres, en dos etapas, durante, fase post-absorción (10 h post-prandial) y la fase de absorción (2 h post-prandial - FPA) dos

horas antes y después de la comida proporcionada a la 1900 horas respectivamente. Durante la fase de absorción la CS de todos los aminoácidos fue superior en comparación con la etapa de post-absorción ( $P < 0.05$ ) respuesta que era esperada. En promedio de las 2 etapas Val mostro la mayor CS ( $P=0.005$ ) seguida por Arg ( $P=0.001$ ) y leucina ( $P=0.004$ ) a diferencia de estos la menor SC es la de Met ( $P=0.042$ ) en promedio y para ambas etapas; además es notoria la marcada variación entre AA en el incremento relativo de la CS. Como nos muestra el Cuadro 6 la CS de Lis en la fase de absorción incrementó 100% comparada con la de post-absorción, seguida por Arg (56%) y Tre (43%). En contraste, la CS de Ile, Leu y Val (AA de cadena ramificada) se incrementó solamente entre 15 y 22%.

**Cuadro 6.** Concentración sérica de aminoácidos esenciales a 2.0 h preprandial y 2,0 h postprandial en cerdos de estrés por calor.

Toma de muestra					
Aminoácido	Preprandial	Postprandial	Diferencia, % <sup>a</sup>	SEM	P =
Arginina	28.58	42.13	56	2.35	0.001
Histidina	11.88	14.32	21	0.63	0.023
Isoleucina	17.47	18.88	15	0.61	0.018
Leucina	24.86	28.89	22	0.97	0.004
Lisina	11.33	21.38	100	1.19	<0.001
Metionina	2.94	4.11	24	0.1	0.042
Fenilalanina	13.88	17.93	34	0.78	0.003
Treonina	19.62	26.65	43	1.25	0.001
Triptofano	10.98	14.17	29	0.73	0.014
Valina	35.89	41.45	20	1.32	0.005

<sup>a</sup> diferencia relativa entre la CS preprandial y posprandial

La concentración sérica de los AA no esenciales se muestra en el Cuadro 7. La CS de Asp y Cis fue menor en la fase de post-absorción ( $P < 0.05$ ), mientras que la CS del resto de los AA no esenciales, fue mayor durante la fase de absorción ( $P < 0.05$ ). De manera muy notable, la CS de Cis ( $P < 0.001$ ) fue más de 30 veces superior en la fase post-absorción, y la de Gln ( $P = 0.004$ ) fue alrededor de 28 veces superior en la fase de absorción. La CS de Tir no mostro diferencia alguna entre las dos fases.

**Cuadro 7.** Concentración sérica de aminoácidos esenciales a 2.0 h preprandial y 2,0 h postprandial en cerdos de estrés por calor.

Aminoácido	Toma de muestra		Diferencia, % <sup>a</sup>	SEM	P =
	Preprandial	Postprandial			
Alanina	24.75	51.85	222	3.70	<0.001
Asparagina	10.13	14.89	212	1.53	0.053
Aspartato	15.02	5.18	-189	1.76	0.003
Cisteína	21.42	0.71	-3202	2.50	<0.001
Glutamato	9.76	18.71	185	2.98	<0.001
Glutamina	2.45	70.80	2405	1.70	0.004
Glicina	12.03	64.91	682	2.54	<0.001
Prolina	17.00	58.76	415	2.66	<0.001
Serina	9.58	23.94	245	1.60	<0.001
Tirosina	31.01	23.67	-36	3.65	0.186

<sup>a</sup> diferencia relativa entre la CS preprandial y posprandial

**Cuadro 8.** Concentraciones sericas de los metabolitos de aminoacidos analizados 2 h preprandia y 2 h posprandia en cerdos en estres por calor consumiendo una dieta baja en proteina suplementada con AA libres.

Amino acido	Toma de muestra		SEM	P =
	Preprandia	Postprandia		
1-meti-histidina	4.56	6.37	2.77	0.655
3-methyl-histina	1.48	1.62	0.08	0.218
Carnosina	4.68	4.53	0.26	0.693
Citrulina	10.46	12.55	1.30	0.281
Cistatationina / alocistationina	0.37	0.36	0.04	0.915
Homocistina	0.12	0.16	0.03	0.418
Hidroxilisina	0.53	0.91	0.24	0.293
Hidroxiprolina	10.99	12.90	0.60	0.048
Ornitina	12.09	17.32	1.35	0.021
Fosforosina	2.96	3.11	0.22	0.649
Sarcosina	1.67	2.18	0.31	0.272
Taurina	16.89	17.29	1.72	0.875
Urea	260	262	20	0.964
Ácido $\alpha$ aminoadípico	2.61	3.68	0.41	0.095
Ácido $\alpha$ amino - n - butírico	0.52	0.72	0.04	0.008
acido amino $\beta$ - isobutírico	0.56	0.64	0.04	0.250

## VII. DISCUSIÓN

### 8.1 Comportamiento productivo

En este estudio donde el porcentaje de proteína para la dieta adicionada con AA libres fue de 14 % y para la dieta con proteína intacta fue de 22%, no hubo diferencia en la GDP, EA y peso de la canal en ambos tratamientos resultados que concuerdan con lo mostrados por Morales et al. (2015) utilizando los mismos niveles de proteína en las dietas. Las GDP similares entre ambos tratamientos y el mayor rendimiento en la canal de cerdos alimentados con la dieta baja en proteína y con inclusión de AA libres podrían atribuirse a que el tracto gastrointestinal y órganos suelen ser mayores en animales que consumen una dieta alta en proteína, debido al trabajo que realizan al catabolizar los excesos de estas dietas. En un estudio hecho para evaluar la influencia del porcentaje de proteína en la dieta sobre parámetros productivos en cerdos expuestos a alta TA se encontró que con 14% de PC+ AA los animales presentan una reducción en la GDP, en comparación con los animales que consumieron un nivel alto de PC (17%) y al igual que en este estudio la EA no fue influenciada por el nivel de proteína (Ferreira et al., 2007). En otro estudio realizado para determinar el efecto de la alimentación con un nivel de PC alto (16%) y un nivel bajo (12 %) con y sin suplementación de AA libres se encontró que los cerdos alimentados con la dieta de 12% de CP + AA alcanzaron niveles similares de crecimiento y tasas de acumulación de agua, proteínas y lípidos que aquellos cerdos alimentados con la dieta 16% CP, sin embargo el ritmo de crecimiento en animales alimentados con dietas sin suplementación de AA, fue más lento (Kerr et al., 2003). Anteriormente Figueroa et al. (2000) sugirieron que los parámetros productivos de los cerdos no se afectan cuando la proteína cruda en la dieta se reduce de 16 a 12% y se añaden aminoácidos. Con tratamientos similares a los ya mencionados pero con la adición de solo tres AAE (Lis, Trp, Tre), Kerr y Easter (1995) observaron que los animales tuvieron un mejor rendimiento al consumir la dieta alta en PC, en comparación con aquellos que consumieron la dieta adicionada con AA. Para corroborar que el resultado no se debía a la deficiencia de AAE, realizaron un

estudio donde además adicionaron AANE, y encontraron que el rendimiento de los animales mejoró con la inclusión de estos. De acuerdo con Toledo et al. (2014) estos resultados en el comportamiento productivo, podrían deberse a que la relación incorrecta entre AAE y AANE puede interferir en el metabolismo, un equilibrio adecuado de AA promueve la síntesis de proteínas, lo que implica que la reducción del contenido proteico puede ser limitada, si no existe un adición de AANE.

## 8.2 Transportadores de aminoácidos.

Los transportadores de aminoácidos son proteínas ligadas a la membrana, que actúan como sensores, mediando la translocación del sustrato a través de las membranas biológicas y expresados ampliamente en todo el cuerpo (Taylor, 2014). La expresión de B<sup>0</sup> en íleon tendió a incrementarse, este resultado difiere a los resultados mostrados por Morales et al. (2015) donde en animales con condiciones similares, B<sup>0</sup> no fue diferente en ningún segmento del intestino delgado. El sistema B<sup>0</sup> es el principal transportador apical neutro de aminoácidos en el intestino delgado, con altos niveles en yeyuno e íleon, contrario a los niveles de duodeno y su ausencia en colon (Romeo et al., 2006), algunos estudios han demostrado que el EC causa daños al intestino, (Yu et al., 2010) principalmente la descamación (Cui y Gu, 2015) altura de vellosidades y profundidad de cripta (Pearce et al., 2013); cuando se afecta la morfología intestinal es probable que haya mayor pérdida de células de absorción y por tanto menor expresión de genes que codifican para transportadores de AA, la expresión génica se ve significativamente alterada debido a la compleja respuesta celular que se desencadena cuando los animales se encuentran expuestos a EC (Sonna et al., 2002). Sin embargo como se puede observar en el Cuadro 5 la expresión de los dos transportadores de AA tuvo una tendencia a ser mayor en animales alimentados con la dieta adicionada con AA libres.

La expresión de los genes que codifican para el sistema de transporte y<sup>+</sup>L también fue mejor en yeyuno de animales que consumieron la dieta baja en proteína con inclusión de AA libres; en el Cuadro 6 se puede observar la elevada CS de



algunos AA que son sustratos para este sistema de transporte como Lis, Arg, his y Leu, es posible que la disponibilidad de estos AA sin la necesidad de ser catabolizados, estimulen de mejor manera la abundancia de transportadores de AA en el intestino delgado y permitan una mayor capacidad de absorción que puede verse reflejada en CS de estos AA.

### 8.3 Concentración sérica de aminoácidos

Para este estudio la CS de AA en las etapas de absorción y post-absorción solo se fue determinada en animales que consumieron la dieta baja en proteína adicionada con AA libres, estos AA también denominado sintéticos han mostrado tener una absorción más rápida, que aquellos unidos a proteína (Partridge et al., 1985; Bertechini, 2004). El constante abastecimiento de AA mediante el flujo sanguíneo, es imprescindible para el correcto desarrollo muscular, por tanto en cerdos el perfil plasmático de AA es importante para maximizar el crecimiento de los animales. Los AA que son proporcionados en la dieta cumplen la función principal de servir como bloques para la biosíntesis de proteínas (Wu et al., 2014; Hou et al., 2015; Neis et al., 2015), además en el intestino delgado como combustible para las células epiteliales y precursores esenciales para la síntesis intestinal de glutatión, óxido nítrico, poliaminas, purina y pirimidina, y aminoácidos (Wu, 1998). En diversas circunstancias, la absorción de AA libres depende de la CS existente (Cynober, 2002); la concentración postprandial en suero refleja la composición de la dieta consumida (Morales et al., 2015) la disponibilidad de los AA (Morales et al., 2016), el estado dinámico del metabolismo de los AA absorbidos en el intestino delgado, las tasas de utilización, y el recambio proteico intracelular (Shikata et al., 2007; Regmi et al., 2016). Lis libre y otros AA de la dieta tienen una absorción intestinal más rápida que aquellos unidos a proteína, además la velocidad de absorción de AA unidos proteínas ha mostrado tener variación debido a la fuente de proteica (Liao et al., 2015). En este estudio la CS de Lis a las dos horas postprandial mostró un incremento relativo de hasta el 100%, de acuerdo con Leibholz et al. (1986) es en ese momento donde la

concentración plasmática de Lis alcanza su pico; es decir existe una amplia disponibilidad de este AA para ser utilizado por los diversos órganos y tejidos. Este AA es el primer limitante en las dietas típicas de cerdos, e importante sustrato para generar proteínas corporales, péptidos y moléculas no pépticas (Liao et al., 2015). Algunos autores ha informado que la deficiencia de este AA puede disminuir la expresión de los transportadores de AA en células epiteliales intestinales (He et al., 2013) y alterar las CS de otros AA (Zeng et al., 2013) afectando la salud y rendimiento en cerdos. Regmi et al. (2016) realizaron un estudio con cerdos en finalización donde encontraron que la concentración de Lis en plasma está estrechamente relacionada con la cantidad de Lis suministrada en la dieta. En este estudio después de Lis, los AA con mayor incremento relativo fueron Arg y Tre con el 56 y 43% respectivamente. El primero es un AA semi- esencial, con múltiples e importantes funciones en el organismo, y Tre es el segundo limitante en las dietas para cerdos; en un estudio realizado en cerdos con alimentación restringida, expuestos a EC donde se analizó la CS de AA libres, se encontró que AAE como Arg, Leu, Lis, fen, Tre y Trp tenían una CS menor en la fase de absorción, además otros AA como Val, Ala, Pro, Ser y Tir mostraron una tendencia a tener una menor concentración, sugiriendo que el EC influye de manera negativa sobre la digestión y absorción (Morales et al., 2016), a excepción de Tir, el presente estudio difiere con lo ya mencionado ya que las CS de Arg, Lis y Tre fueron las más elevadas durante esta fase. Arg está implicado en la resistencia a estrés por calor y estrés oxidativo, donde la exposición al calor y la alteración en las concentraciones de pro-oxidantes y antioxidantes que conducen a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wu et al., 2012) y disminución en la defensa antioxidante (Ganaie et al., 2013; Nisar et al., 2013) produciendo citotoxicidad (Bernabucci et al., 2002; Lord-Fontaine y Averill-Bates, 2002). Se ha informado que Arg es el precursor metabólico de óxido nítrico (NO) en endotelio vascular, mediante la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Debemos recordar que para disipar calor los animales en estrés por calor presentan vasodilatación periférica, este mecanismo es regulado por el incremento en la concentración y síntesis de NO; por tanto, se reconoce una función importante en

Arg y NO para protección en estrés térmico y oxidativo (Hall et al., 2001). Además de ser precursor de NO también lo es de poliamina, creatina y agmatina esenciales para la diferenciación y proliferación de las células (Maeda et al., 2006), en reacciones donde existe inflamación, daño y muerte celular como EC, las poliaminas inducen la migración y crecimiento celular (Satriano, 2004), en procesos traumáticos Arg podría modificar intensamente el metabolismo de poliaminas, lo que explicaría los efectos benéficos de este AA en situaciones especiales (Larqué et al., 2007) principalmente en la cicatrización intestinal (Marc Rhoads and Wu, 2009). La CS de Fen, Leu y Trp, también fueron mayores en la etapa de absorción consistente con la expresión de transportadores de AA° en aquellos animales alimentados con dietas con inclusión de AA libres.

La CS de algunos AA es el resultado de una compleja interacción entre aquellos proporcionados en la dieta, la descomposición de tejido y la síntesis de *novo*; fundamentales para mantener la función fisiológica del organismo, Gln, Glu, Gli y Pro entre otros son considerados AA funcionales reguladores de vías metabólicas esenciales para la supervivencia y un adecuado desarrollo y en situaciones críticas como el estrés, considerados condicionalmente esenciales. Gln es el más abundante en sangre y la principal fuente de energía para enterocitos (Young y Ajami, 2001; Fujita y Yanaga, 2007). Gln participa en la regulación de la proliferación celular, reparación y mantenimiento de la de la barrera intestinal (Rao y Samak, 2012). Debido a las diversas funciones que desempeña en el TGI su demanda en la mucosa intestinal es elevada, superior a 15 g/día (en humanos) y es obtenida primordialmente de la circulación sistémica (Rao y Samak, 2012). En este estudio la CS de Gln es aproximadamente 30 veces menor en la etapa de post absorción, cuando los animales se encontraban expuestos a la TA más elevada, lo que podría indicar que en animales en estrés por calor; Cervantes et al. (2017) realizaron un experimento en cerdos donde analizaron la CS de AA libres en diferentes horarios del día, durante las etapas de absorción y digestión, a las 7000, 1200 y 1600, inmediatamente, 5 horas y 9 horas después de comer respectivamente y observaron que 9 horas post-prandial (similar a la fase post-absorción de este estudio) existe una reducción significativa en la CS de la

mayoría de los AA ( Ala, Arg, Asn, Fen, Gln, Ile, Pro, Ser) en comparación con las muestras tomadas a las 1200 horas.

Gln es necesaria para conservar la integridad del epitelio, estimula la síntesis de proteínas de la mucosa intestinal y protege a los enterocitos de la apoptosis. El metabolismo conduce a la síntesis de *novo* de aminoácidos (Rezaei et al., 2013), el incremento en la CS de Ala en la fase de absorción pudo deberse a que es un aminoácido producto del catabolismo intestinal de la Gln (Fujita y Yanaga, 2007).

La etapa de post-absorción es aquella en la que los animales se encuentran expuestos a la temperatura más elevada del día, lo cual puede generar estrés oxidativo. Para contrarrestar estos efectos el organismo hace uso de un sistema antioxidante que permita minimizar la peroxidación lipídica de las membranas celulares, glutatión es el principal antioxidante (Kerksick y Willoughby, 2005), y Cis, Glu y Gli desempeñan un papel importante en la síntesis de este (Reeds, 2000; Fujita y Yanaga, 2007) En este estudio la CS de Cis fue aproximadamente 30 veces mayor en la etapa post-absorción, es posible que extraordinaria demanda de este AA durante las horas de TA elevada de deba a que ayuda a combatir al EC. En un estudio para investigar el efecto del EC sobre las CS de AA en pollitos; la CS de Tir y Cis disminuyeron significativamente resultados similares a los observado en este estudio (Tabiri et al., 2000).

Tir, y la Pro, son AA condicionalmente esenciales para cerdos jóvenes, particularmente en condiciones estresantes (Rezaei et al., 2013). Reeds, (2000) menciona que en humanos en estado de ayuno la proporción de Pro endógena representa el 7% del flujo de Pro en todo el cuerpo, contrario a la contribución de la síntesis endógena al flujo sanguíneo cuando se ha consumido alimento. En este estudio en que los animales se encontraban en EC se observó que después 2 horas de consumir alimento la CS de Pro fue prácticamente 3 veces más alta que en etapa preprandial. Este AA importante para la generación de colágeno, es más importante sustrato para la síntesis de Arg, ornitina y poliamina que la Gln o el Glu (Reeds y Burrin, 2001).

## IX. CONCLUSIÓN

La incorporación de aminoácidos libres en dietas típicas no ayudo a mejorar el comportamiento productivo de animales expuestos a estrés por calor, sin embargo la existencia de aminoácidos sintéticos, que nos permiten trabajar bajo el concepto de proteína ideal, cumpliendo con lo requerido por el animal, podría contribuir a mejorar la eficiencia de acumulación de proteína, y a reducir la excreción de nitrógeno. Además el gasto energético que se genera por la digestión de las proteínas puede reducirse al ser sustituidos por aminoácidos libres, y así proporcionar mayor disponibilidad de energía para otros procesos metabólicos que ayuden a mantener la homeostasis durante el estrés por calor.

Parece ser que la inclusión de aminoácidos libres en la dieta modifica la abundancia de transportadores de aminoácidos en intestino delgado de cerdos aumentando su capacidad de absorción intestinal que puede verse relegada en la elevada concentración sérica de algunos aminoácidos.

La concentración sérica de algunos aminoácidos muestran que se producen para mantener las funciones fisiológicas normales, algunos ayudan a proteger a las células de lesiones provocadas por el estrés oxidativo, mantener la barrera intestinal o para regular vías metabólicas esenciales en las células y así asegurar la supervivencia frente a condiciones extremas como el estrés por calor.

## X. REFERENCIAS

- Aberle, E. D., R. A. Merkel, J. C. Forrest, and C. W. Alliston. 1974. Physiological responses of stress susceptible and stress resistant pigs to heat stress. *J. Anim. Sci.* 38:954–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4826307>
- Bajka, B. H., N. M. Rigby, K. L. Cross, A. Macierzanka, and A. R. Mackie. 2015. The influence of small intestinal mucus structure on particle transport ex vivo. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 135:73–80.
- Belhadj Slimen, I., T. Najar, A. Ghram, and M. Abdrabba. 2015. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 100:401–412. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpn.12379>
- Le Bellego, L., J. van Milgen, S. Dubois, and J. Noblet. 2001. Energy utilization of low-protein diets in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 79:1259. Available from: <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/79/5/1259>
- Le Bellego, L., J. van Milgen, and J. Noblet. 2002. Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 80:691–701. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11890404>
- Bernabucci, U., N. Lacetera, L. H. Baumgard, R. P. Rhoads, B. Ronchi, and A. Nardone. 2010. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *animal* 4:1167–1183. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S175173111000090X](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S175173111000090X)
- Bernabucci, U., B. Ronchi, N. Lacetera, and A. Nardone. 2002. Markers of Oxidative Status in Plasma and Erythrocytes of Transition Dairy Cows During Hot Season. *J. Dairy Sci.* 85:2173–2179. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12362449>

- Bertechini, A. G. 2004. *Nutrição de Monogástrico*. (L. UFLA/FAEPE, editor.). Brasil.
- Bröer, A., K. Klingel, S. Kowalczyk, J. E. J. Rasko, J. Cavanaugh, and S. Bröer. 2004. Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J. Biol. Chem.* 279:24467–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044460>
- Bröer, S. 2008a. Apical Transporters for Neutral Amino Acids: Physiology and Pathophysiology. *Physiology* 23. Available from: <http://physiologyonline.physiology.org/content/23/2/95.full.pdf+html>
- Bröer, S. 2008b. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol. Rev.* 88. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/88/1/249.long>
- Bröer, S., and M. Palacín. 2011. The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases. *Biochem. J.* 436. Available from: <http://www.biochemj.org/content/436/2/193.long>
- Camargo, S. M. R., V. Makrides, L. V. Virkki, I. C. Forster, and F. Verrey. 2005. Steady-state kinetic characterization of the mouse B0AT1 sodium-dependent neutral amino acid transporter. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 451:338–348. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00424-005-1455-x>
- Camargo, S. M. R., D. Singer, V. Makrides, K. Huggel, K. M. Pos, C. A. Wagner, K. Kuba, U. Danilczyk, F. Skovby, R. Kleta, J. M. Penninger, and F. Verrey. 2009. Tissue-Specific Amino Acid Transporter Partners ACE2 and Collectrin Differentially Interact With Hartnup Mutations. *Gastroenterology* 136:872–882.e3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185582>

- Cervantes, M., N. Ibarra, N. Vásquez, F. Reyes, E. Avelar, S. Espinoza, and A. Morales. 2017. Serum concentrations of free amino acids in growing pigs exposed to diurnal heat stress fluctuations. *J. Therm. Biol.* 69:69–75. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030645651730150X>
- Christensen, H. N. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 70. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/70/1/43.long>
- Christison, G. I., and H. D. Johnson. 1972. Cortisol turnover in heat-stressed cow. *J. Anim. Sci.* 35:1005–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5085291>
- Church, D. C., W. G. Pond and K. R. Pond. 2007. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales*. Limusa Wiley. México, D.F. 129-130 p.
- Coffey, R. D., G. R. Parker, and K. M. Laurent. 1995. *Feeding Growing-Finishing Pigs to Maximize Lean Growth Rate*.
- Collier, R. J., D. K. Beede, W. W. Thatcher, L. A. Israel, and C. J. Wilcox. 1982. Influences of Environment and Its Modification on Dairy Animal Health and Production. *J. Dairy Sci.* 65:2213–2227. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6759540>
- Cui, Y., and X. Gu. 2015. Proteomic changes of the porcine small intestine in response to chronic heat stress. *J. Mol. Endocrinol.* 55:277–293. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26416815>
- Cynober, L. A. 2002. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* 18:761–766. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900702007803>



- Danilczyk, U., R. Sarao, C. Remy, C. Benabbas, G. Stange, A. Richter, S. Arya, J. A. Pospisilik, D. Singer, S. M. R. Camargo, V. Makrides, T. Ramadan, F. Verrey, C. A. Wagner, and J. M. Penninger. 2006. Essential role for collectrin in renal amino acid transport. 444. Available from: <https://search.proquest.com/openview/03c085a1afd164706381095bbd2c66e8/1?pq-origsite=gscholar&cbl=40569>
- Das, R., L. Sailo, N. Verma, P. Bharti, J. Saikia, Imtiwati, and R. Kumar. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Vet. world* 9:260–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27057109>
- Deng, D., P. Sun, C. Yan, M. Ke, X. Jiang, L. Xiong, W. Ren, K. Hirata, M. Yamamoto, S. Fan, and N. Yan. 2015. Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature* 526:391–396. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature14655>
- Dickson, T.R. 2000. *Introducción a la química*. Publicaciones culturales, 17ed., 21-22 p.
- Ferreira, R. A., R. F. M. de Oliveira, J. L. Donzele, E. P. Saraiva, F. C. de O. Silva, U. A. D. Orlando, and R. G. M. V. Vaz. 2007. Redução da proteína bruta e suplementação de aminoácidos para suínos machos castrados dos 30 aos 60 kg mantidos em ambiente de alta temperatura. *Rev. Bras. Zootec.* 36:818–824. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-35982007000400010&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982007000400010&lng=pt&tlng=pt)
- Figuroa, J., A. Lewis, and P. S. Miller. 2000. Nitrogen Balance and Growth Trials With Pigs Fed Low-Crude Protein, Amino Acid-Supplemented Diets. *Nebraska Swine Reports*. Available from: [http://digitalcommons.unl.edu/coopext\\_swine/110](http://digitalcommons.unl.edu/coopext_swine/110)

- Fotiadis, D., Y. Kanai, and M. Palacín. 2013. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol. Aspects Med.* 34:139–158. Available from: [http://ac.els-cdn.com/S0098299712001215/1-s2.0-S0098299712001215-main.pdf?\\_tid=8a53c634-82b1-11e7bc20000aacb35e&acdnat=1502908650\\_4cb0c4912f388b677ce8f0abbbb802e5](http://ac.els-cdn.com/S0098299712001215/1-s2.0-S0098299712001215-main.pdf?_tid=8a53c634-82b1-11e7bc20000aacb35e&acdnat=1502908650_4cb0c4912f388b677ce8f0abbbb802e5)
- Fujita, T., and K. Yanaga. 2007. Association between glutamine extraction and release of citrulline and glycine by the human small intestine. *Life Sci.* 80:1846–1850. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320507001798>
- Ganaie, A. H., G. Shanker, N. Bumla A., G. R.S, N. A. Mir, W. SA, and G. Dudhatra. 2013. Biochemical and Physiological Changes during Thermal Stress in Bovines. *J. Vet. Sci. Technol.* 4:1–6. Available from: <https://www.omicsonline.org/2157-7579/2157-7579-4-126.digital/2157-7579-4-126.html>
- Garrido, P. A., R. Olmo, A. C. Castel, O. C. Mendoza, G. C. Villaverde, and L. C. Teijón. 2001. *Bioquímica metabólica*. Editoriali.Tébar.
- Gisolfi, C. V. 2000. Is the GI System Built For Exercise? *Physiology* 15. Available from: <http://physiologyonline.physiology.org/content/15/3/114.long>
- Hahn, G. L. 1999. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *J. Anim. Sci.* 77 Suppl 2:10–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15526777>
- Hall, D. M., G. R. Buettner, L. W. Oberley, L. Xu, R. D. Matthes, and C. V. Gisolfi. 2001. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 280. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/content/280/2/H509.long>
- He, L., H. Yang, Y. Hou, T. Li, J. Fang, X. Zhou, Y. Yin, L. Wu, M. Nyachoti, and G. Wu. 2013. Effects of dietary l-lysine intake on the intestinal mucosa and expression of CAT genes in weaned piglets. *Amino Acids* 45:383–391. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23722415>

- Hediger, M. A., M. F. Romero, J.-B. Peng, A. Rolfs, H. Takanaga, and E. A. Bruford. 2004. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflgers Arch. Eur. J. Physiol.* 447:465–468. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00424-003-1192-y>
- Hirata, Y., A. H. Broquet, L. Menchén, and M. F. Kagnoff. 2007. Activation of innate immune defense mechanisms by signaling through RIG-I/IPS-1 in intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 179. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/179/8/5425.long>
- Horowitz, M., L. Eli-Berchoer, I. Wapinski, N. Friedman, and E. Kodesh. 2004. Stress-related genomic responses during the course of heat acclimation and its association with ischemic-reperfusion cross-tolerance. *J. Appl. Physiol.* 97. Available from: <http://jap.physiology.org/content/97/4/1496.long>
- Hou, Y., K. Yao, Y. Yin, and G. Wu. 2016. Endogenous Synthesis of Amino Acids Limits Growth, Lactation, and Reproduction in Animals. *Adv. Nutr.* 7:331–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980816>
- Hou, Y., Y. Yin, and G. Wu. 2015. Dietary essentiality of nutritionally non-essential amino acids for animals and humans. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 240:997–1007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26041391>
- 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 humidities. *J. Anim. Sci.* 83:1385. Available from: <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/83/6/0831385>

- Kanai, Y., Y. Fukasawa, S. H. Cha, H. Segawa, A. Chairoungdua, D. K. Kim, H. Matsuo, J. Y. Kim, K. Miyamoto, E. Takeda, and H. Endou. 2000. Transport properties of a system y<sup>+</sup>L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 275:20787–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777485>
- Kerr, B. J., and R. A. Easter. 1995. Effect of feeding reduced protein, amino acid-supplemented diets on nitrogen and energy balance in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 73:3000. Available from: <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/73/10/3000>
- Kerr, B. J., L. L. Southern, T. D. Bidner, K. G. Friesen, and R. A. Easter. 2003. Influence of dietary protein level, amino acid supplementation, and dietary energy levels on growing-finishing pig performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 81:3075–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14677864>
- Kim, D. K., I. J. Kim, S. Hwang, J. H. Kook, M.-C. Lee, B. A. Shin, C. S. Bae, J. H. Yoon, S. G. Ahn, S. A. Kim, Y. Kanai, H. Endou, and J.-K. Kim. 2004. System l-amino acid transporters are differently expressed in rat astrocyte and C6 glioma cells. *Neurosci. Res.* 50:437–446. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010204002068>
- Kiriya, Y., and H. Nochi. 2016. D-Amino Acids in the Nervous and Endocrine Systems. *Scientifica (Cairo)*. 2016:6494621. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28053803>

- Kleta, R., E. Romeo, Z. Ristic, T. Ohura, C. Stuart, M. Arcos-Burgos, M. H. Dave, C. A. Wagner, S. R. M. Camargo, S. Inoue, N. Matsuura, A. Helip-Wooley, D. Bockenbauer, R. Warth, I. Bernardini, G. Visser, T. Eggermann, P. Lee, A. Chairoungdua, P. Jutabha, E. Babu, S. Nilwarangkoon, N. Anzai, Y. Kanai, F. Verrey, W. A. Gahl, and A. Koizumi. 2004. Mutations in SLC6A19, encoding B(0)AT1, cause Hartnup disorder. *Nat Genet* 36:999–1002. Available from: <https://search.proquest.com/openview/78b43663b8d20d50a378533a7e64d2af/1?pq-origsite=gscholar&cbl=33429>
- Kozar, R. A., S. G. Schultz, R. J. Bick, B. J. Poindexter, R. DeSoignie, and F. A. Moore. 2004. Enteral glutamine but not alanine maintains small bowel barrier function after ischemia/reperfusion injury in rats. *Shock* 21:433–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087819>
- Laguna, J., y E. Piña. 2002 *Bioquímica de laguna*. Editorial Manual moderno, México UNAM, 114p.
- Lambert, G. P. 2009. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci* 87:101–108. Available from: [http://www.journalofanimalscience.org/content/87/14\\_suppl/E101](http://www.journalofanimalscience.org/content/87/14_suppl/E101)
- Larqué, E., M. M. Sabater, and M. . S. Zamora. 2007. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition* 23:87–95. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900706003583?via%3Dihub>
- Leibholz, J., R. J. Love, Y. Mollah, and R. R. Carter. 1986. The absorption of dietary L-lysine and extruded L-lysine in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 15:141–148. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0377840186900210>
- Lewis AJ (2001) Amino acids in swine nutrition. In Lewis A, Southern JL (Eds.) *Swine Nutrition*. 2nd ed. CRC Press. New york, USA. Pp. 151-186

- Liao, S. F., E. S. Vanzant, D. L. Harmon, K. R. McLeod, J. A. Boling, J. C. Matthews, J. A. Boling, and J. C. Matthews. 2009. Ruminal and abomasal starch hydrolysate infusions selectively decrease the expression of cationic amino acid transporter mRNA by small intestinal epithelia of forage-fed beef steers. *J. Dairy Sci.* 92:1124–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19233805>
- Liao, S. F., T. Wang, and N. Regmi. 2015. Lysine nutrition in swine and the related monogastric animals: muscle protein biosynthesis and beyond. Springerplus 4:147. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25830085>
- Lin, L., S. W. Yee, R. B. Kim, and K. M. Giacomini. 2015. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14:543–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26111766>
- Liu, F., J. Yin, M. Du, P. Yan, J. Xu, X. Zhu, and J. Yu. 2009. Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with downregulation of epithelial growth factor signaling. *J. Anim. Sci.* 87:1941–1949. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19213704>
- Lord-Fontaine, S., and D. A. Averill-Bates. 2002. Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. *Free Radic. Biol. Med.* 32:752–765. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584902007694>
- Maeda, T., T. Wakasawa, Y. Shima, I. Tsuboi, S. Aizawa, and I. Tamai. 2006. Role of polyamines derived from arginine in differentiation and proliferation of human blood cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29:234–239. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/29.234?from=CrossRef>
- Mahan, D. C., and R. G. Shields. 1950. Essential and Nonessential Amino Acid Composition of Pigs from Birth to 145 Kilograms of Body Weight , and Comparison to Other Studies 1 , 2 ABSTRACT : :513–521.

- Marai, I. F. M., A. A. El-Darawany, A. Fadiel, and M. A. M. Abdel-Hafez. 2007. Physiological traits as affected by heat stress in sheep—A review. *Small Rumin. Res.* 71:1–12.
- Marc Rhoads, J., and G. Wu. 2009. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids* 37:111–122. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-008-0225-4>
- Matthews, D. M. 1972. Intestinal absorption of amino acids and peptides. *Proc. Nutr. Soc.* 31:171–177. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0029665172000357](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0029665172000357)
- McDonald, P., R. A. Edwards, and J. F. D. Greenhalgh. 1993. *Animal Nutrition*. 4 ed. Acribia, Zaragoza España.
- Méndez, V., E. Avelar, A. Morales, M. Cervantes, A. Araiza, and D. González. 2011. A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genet. Mol. Res.* 10:3251–3255. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194189>
- Mertz, E. T., W. M. Beeson, and H. D. Jackson. 1952. Classification of essential amino acids for the weanling pig. *Arch. Biochem. Biophys.* 38:121–128. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986152900155>
- Van Milgen, J., and J.-Y. Dourmad. 2015. Concept and application of ideal protein for pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25937926>
- 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. *J. Anim. Sci.* 93:2154–2164. Available from: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/93/5/2154>

- Morales, A., S. E. M. Cota, N. O. Ibarra, N. Arce, J. K. Htoo, and M. Cervantes. 2016. Effect of heat stress on the serum concentrations of free amino acids and some of their metabolites in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 94:2835. Available from: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/94/7/2835>
- Neis, E. P. J. G., C. H. C. Dejong, and S. S. Rensen. 2015. The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients* 7:2930–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25894657>
- Nisar, A. N., Mudasir Sultana, Hina Ashraf Waiz, Parveez Ahmad Para, and Sajad Ahmad Dar. 2013. Oxidative Stress - Threat to Animal Health and Production -. *Int. J. Livest. Res.* 3:76–83. Available from: <http://www.scopemed.org/?mno=26728>
- Noblet, J., H. Fortune, X. S. Shi, and S. Dubois. 1994. Prediction of net energy value of feeds for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 72:344–354. Available from: <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/articles/72/2/344>
- NRC, 2012. Nutrient Requirements of Pigs, Ninth Revised Edition. National Academy Press, Washington, D.C
- O'Mara, M., A. Oakley, and S. Bröer. 2006. Mechanism and putative Structure of B0-like neutral amino acid transporters. *J. Membr. Biol.* 213:111–118. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00232-006-0879-3>
- Oxender, D. L., and H. N. Christensen. 1963. Distinct Mediating Systems for the Transport of Neutral Amino Acids by the Ehrlich Cell\*. *THB JOURNAL BIOLOGICAL Chem.* 238. Available from: <http://www.jbc.org/content/238/11/3686.full.pdf>
- Palacín, M., V. Nunes, M. Font-Llitjós, M. Jiménez-Vidal, J. Fort, E. Gasol, M. Pineda, L. Feliubadaló, J. Chillarón, and A. Zorzano. 2005. The Genetics of Heteromeric Amino Acid Transporters. *Physiology* 20. Available from: <http://physiologyonline.physiology.org/content/20/2/112.long#ref-16>



- Parpura, V., and A. Verkhatsky. 2013. Astroglial amino acid-based transmitter receptors. *Amino Acids* 44:1151–1158. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-013-1458-4>
- Partridge, I. G., A. G. Low, and H. D. Keal. 1985. A note on the effect of feeding frequency on nitrogen use in growing boars given diets with varying levels of free lysine. *Anim. Prod.* 40:375–377. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0003356100025526](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0003356100025526)
- Patience, J. F., J. F. Umboh, R. K. Chaplin, and C. M. Nyachoti. 2005. Nutritional and physiological responses of growing pigs exposed to a diurnal pattern of heat stress. *Livest. Prod. Sci.* 96:205–214. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301622605000436>
- Pearce, S. C., S. M. Lonergan, E. Huff-Lonergan, L. H. Baumgard, and N. K. Gabler. 2015. Acute heat stress and reduced nutrient intake alter intestinal proteomic profile and gene expression in pigs. R. N. PENA i SUBIRÀ, editor. *PLoS One* 10:e0143099. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0143099>
- Pearce, S. C., V. Mani, R. L. Boddicker, J. S. Johnson, T. E. Weber, J. W. Ross, R. P. Rhoads, L. H. Baumgard, and N. K. Gabler. 2013. Heat stress reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing Ppigs. G. López-Lluch, editor. *PLoS One* 8:e70215. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0070215>
- Peña A., A. Arroyo, A. Gómez, R. Tapia. 2004. *Bioquímica*. Limusa, 2 ed., México D, F. 66 p. Press. New York, Ny. 524 P.
- Platell, C., R. Mccauley, R. Mcculloch, and J. Hall. 1993. The Influence of Parenteral Glutamine and Branched-Chain Amino Acids on Total Parenteral Nutrition—Induced Atrophy of the Gut. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 17:348–354. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8271360>

- Pramod, A. B., J. Foster, L. Carvelli, and L. K. Henry. 2013. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol. Aspects Med.* 34:197–219. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23506866>
- Qi, H., P. Wang, C. Liu, M. Li, S. Wang, Y. Huang, and F. Wang. 2011. Involvement of HIF-1 $\alpha$  in MLCK-dependent endothelial barrier dysfunction in hypoxia. *Cell. Physiol. Biochem.* 27:251–262. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21471714>
- Quiniou, N., S. Dubois, and J. Noblet. 2000. Voluntary feed intake and feeding behaviour of group-housed growing pigs are affected by ambient temperature and body weight. *Livest. Prod. Sci.* 63:245–253. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301622699001359>
- Rao, R., and G. Samak. 2012. Role of Glutamine in Protection of Intestinal Epithelial Tight Junctions. *J. Epithel. Biol. Pharmacol.* 5:47–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25810794>
- Reeds, P. J. 2000. Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J. Nutr.* 130:1835S–40S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10867060>
- Reeds, P. J., and D. G. Burrin. 2001. Glutamine and the bowel. *J. Nutr.* 131:2505S–8S; discussion 2523S–4S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533302>
- Regmi, N., T. Wang, M. A. Crenshaw, B. J. Rude, G. Wu, and S. F. Liao. 2016. Effects of dietary lysine levels on plasma free amino acid profile in late-stage finishing pigs. *Springerplus* 5:888. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27386336>

- Renaudeau, D., C. Anais, L. Tel, and J. L. Gourdine. 2010. Effect of temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using a nonlinear function. *J. Anim. Sci.* 88:3715–3724. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20622186>
- Rezaei, R., W. Wang, Z. Wu, Z. Dai, J. Wang, and G. Wu. 2013. Biochemical and physiological bases for utilization of dietary amino acids by young Pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4:7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23445937>
- Rives, M.-L., J. A. Javitch, and A. D. Wickenden. 2017. Potentiating SLC transporter activity: Emerging drug discovery opportunities. *Biochem. Pharmacol.* 135:1–11. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295217300874>
- Romeo, E., M. H. Dave, D. Bacic, Z. Ristic, S. M. R. Camargo, J. Loffing, C. A. Wagner, and F. Verrey. 2006. Luminal kidney and intestine SLC6 amino acid transporters of B0AT-cluster and their tissue distribution in *Mus musculus*. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 290. Available from: <http://ajprenal.physiology.org/content/290/2/F376>
- Sanz Fernandez, M. V., S. C. Pearce, N. K. Gabler, J. F. Patience, M. E. Wilson, M. T. Socha, J. L. Torrison, R. P. Rhoads, and L. H. Baumgard. 2014. Effects of supplemental zinc amino acid complex on gut integrity in heat-stressed growing pigs. *animal* 8:43–50. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S1751731113001961](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1751731113001961)
- Satriano, J. 2004. Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines: Review article. *Amino Acids* 26:321–329. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-004-0078-4>

- Seow, H. F., S. Bröer, A. Bröer, C. G. Bailey, S. J. Potter, J. A. Cavanaugh, and J. E. J. Rasko. 2004. Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19. *Nat. Genet.* 36:1003–1007. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng1406>
- Shikata, N., Y. Maki, Y. Noguchi, M. Mori, T. Hanai, M. Takahashi, and M. Okamoto. 2007. Multi-layered network structure of amino acid (AA) metabolism characterized by each essential AA-deficient condition. *Amino Acids* 33:113–121. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-006-0412-0>
- Sonna, L. A., J. Fujita, S. L. Gaffin, and C. M. Lilly. 2002. Invited Review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* 92. Available from: <http://jap.physiology.org/content/92/4/1725.long>
- Stahly, T. S., and G. L. Cromwell. 1986. Responses to dietary additions of fiber (alfalfa meal) in growing pigs housed in a cold, warm or hot thermal environment. *J. Anim. Sci.* 63:1870–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3029008>
- Tabiri, H. Y., K. Sato, K. Takahashi, M. Toyomizu, Y. Akiba<sup>1</sup>, and T. Amamiyamachi. 2000. Effect of acute heat stress on plasma amino acids concentration of broiler Chickens. *Jpn. Poult. Sci.*, 37:86–94. Available from: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpsa1964/37/2/37\\_2\\_86/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpsa1964/37/2/37_2_86/_pdf)
- Taylor, P. M. 2014. Role of amino acid transporters in amino acid sensing. *Am. J. Clin. Nutr.* 99:223S–230S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24284439>
- Toledo, J. B., A. C. Furlan, P. C. Pozza, J. Carraro, G. Moresco, S. L. Ferreira, A. G. Gallego, J. B. Toledo, A. C. Furlan, P. C. Pozza, J. Carraro, G. Moresco, S. L. Ferreira, and A. G. Gallego. 2014. Reduction of the crude protein content of diets supplemented with essential amino acids for piglets

weighing 15 to 30 kilograms. *Rev. Bras. Zootec.* 43:301–309. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-35982014000600301&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982014000600301&lng=en&tlng=en)

Torrents, D., R. Estévez, M. Pineda, E. Fernández, J. Lloberas, Y. B. Shi, A. Zorzano, and M. Palacín. 1998. Identification and characterization of a membrane protein ( $\gamma$ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity  $\gamma$ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Biol. Chem.* 273:32437–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829974>

Verrey, F., E. I. Closs, C. A. Wagner, M. Palacin, H. Endou, and Y. Kanai. 2004. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 447:532–542. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00424-003-1086-z>

Voet, D., J. G. Voet. 2006. *Bioquímica, Medica panamericana*, 3 ed., pp 71, 1023, 1052.

Wang, J., Z. Wu, D. Li, N. Li, S. V Dindot, M. C. Satterfield, F. W. Bazer, and G. Wu. 2012. Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. *Antioxid. Redox Signal.* 17:282–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22044276>

Wilson, T. E., and C. G. Crandall. 2011. Effect of thermal stress on cardiac function. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 39:12–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21088607>

Wu, G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr.* 128:1249–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687539>

Wu, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37:1–17. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-009-0269-0>

- Wu, G. 2010. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv. Nutr.* 1:31–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22043449>
- Wu, G. 2014. Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5:34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24999386>
- Wu, G., F. W. Bazer, Z. Dai, D. Li, J. Wang, and Z. Wu. 2014. Amino Acid Nutrition in Animals: Protein Synthesis and Beyond. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2:387–417. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-022513-114113>
- Wu, G., Z. Wu, Z. Dai, Y. Yang, W. Wang, C. Liu, B. Wang, J. Wang, and Y. Yin. 2013. Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids* 44:1107–1113. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-012-1444-2>
- Wu, H., Y. Zhao, Y. Guo, L. Xu, and B. Zhao. 2012. Significant longevity-extending effects of a tetrapeptide from maize on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Food Chem.* 130:254–260. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611009745>
- Yan, Y. E., Y. Q. Zhao, H. Wang, and M. Fan. 2006. Pathophysiological factors underlying heatstroke. *Med. Hypotheses* 67:609–617. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987706001538>
- Young, V. R., and A. M. Ajami. 2001. Glutamine: the emperor or his clothes? *J. Nutr.* 131:2449S–59S; discussion 2486S–7S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533293>
- Yu, J., P. Yin, F. Liu, G. Cheng, K. Guo, A. Lu, X. Zhu, W. Luan, and J. Xu. 2010. Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and gene expression study. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 156:119–128.

Zeng, P. L., H. C. Yan, X. Q. Wang, C. M. Zhang, C. Zhu, G. Shu, and Q. Y. Jiang. 2013. Effects of dietary lysine levels on apparent nutrient digestibility and serum amino Acid absorption mode in growing pigs. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 26:1003–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25049879>

Zumbach, B., I. Misztal, S. Tsuruta, J. P. Sanchez, M. Azain, W. Herring, J. Holl, T. Long, and M. Culbertson. 2008. Genetic components of heat stress in finishing pigs: Development of a heat load function. *J. Anim. Sci.* 86:2082–2088. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18469060>