

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Ciencias Agrícolas



**ADICIÓN DE METIONINA A DIETAS PARA CERDOS EN
ESTRÉS POR CALOR: COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO,
CONCENTRACIÓN SÉRICA DE AMINOÁCIDOS Y EXPRESIÓN
DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EN INTESTINO
DELGADO**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

VERONICA SÁNCHEZ VÁZQUEZ

DIRECTORA

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

MEXICALI, B. C.

AGOSTO DE 2021

La presente tesis titulada “Adición de metionina a dietas para cerdos en estrés por calor: comportamiento productivo, concentración sérica de aminoácidos y expresión de transportadores de aminoácidos en intestino delgado” fue realizada por la C. Veronica Sánchez Vázquez, dirigida por la Dra. Adriana Morales Trejo, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

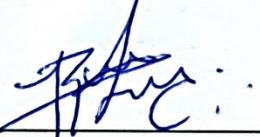
**MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS
DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

Comité particular

Presidente 
Dra. Adriana Morales Trejo

Sinodal 
Dr. Miguel Cervantes Ramirez

Sinodal 
Dr. Ernesto Avelar Lozano

Sinodal 
Dra. Reyna Lucero Camacho Morales

Sinodal 
Dr. Lorenzo Buenabad Carrasco

“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”

Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México, Agosto de 2021

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Baja California, al Instituto de Ciencias Agrícolas, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por solventar los gastos económicos para la realización de mis estudios de posgrado.

A mi directora de tesis la Dra. Adriana Morales Trejo, por compartir sus conocimientos, la paciencia y la confianza para la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Miguel Cervantes Ramírez, por la oportunidad, la confianza y la motivación para llevar a cabo este proyecto de investigación.

Al Dr. Ernesto Avelar Lozano, por su apoyo, amistad y las recomendaciones sugeridas para este proyecto de tesis.

A la Dra. Lucero Camacho Morales, por los conocimientos compartidos y el apoyo brindado para llevar a término este proyecto.

Al Dr. Lorenzo Buenabad Carrasco por su amistad, por compartir sus conocimientos y su contribución en la revisión de este proyecto de tesis.

A todos los académicos del Instituto de Ciencias Agrícolas que contribuyeron en mi formación académica.

A todos mis compañeros del Cuerpo Académico de Nutrición Animal.

A todas las amistades que me brindaron su apoyo durante mi estancia en el posgrado.

Dedicatoria

A mis padres Macario y Francisca:

Por darme la vida, el amor, el apoyo incondicional, los valores inculcados, por creer en mi y por ser un gran ejemplo de vida.

A mis hermanos Victoria, Adán y Manuel:

Por apoyarme siempre, por ser un gran ejemplo a seguir y por compartir los mejores momentos de mi vida, esto también se lo debo a ustedes.

A mis sobrinos:

Por llenarme de felicidad.

Abreviaturas

AA.- Aminoácidos

Met.- Metionina

EC.- Estrés por calor

TN.- Termoneutralidad

GDP.- Ganancia diaria de peso

CDA.- Consumo diario de alimento

G:C.- Relación ganancia de peso: consumo de alimento

TN100.- T1: cerdos que recibieron la dieta testigo (Met100)

EC100.- T2: cerdos en estrés por calor que recibieron la dieta testigo

EC120.- T3: cerdos en estrés por calor que recibieron una dieta con 120 % del requerimiento de Met (Met 120)

EC140.-T4: cerdos en estrés por calor que recibieron una dieta con 140 % del requerimiento de Met (Met140)

EC160.-T5: cerdos en estrés por calor que recibieron una dieta con 160 % extra del requerimiento de Met (Met160)

TA.- Temperatura ambiente

HR.- Humedad relativa

TC.- Temperatura corporal

TI.- Temperatura intestinal

FR.- Frecuencia respiratoria

B⁰.- Transportador de AA neutros dependiente de sodio

b^{0,+}.- Transportador de AA catiónicos y neutros, independiente de sodio

y+L.- Transportador de AA catiónicos y neutros, dependiente sodio

RT.-Transcripción reversa

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR.- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo

dNTP's.- Desoxirribonucleótidos trifosfatados

Lis.- Lisina

Tre.-Treonina

Trp.- Triptófano

Val.- Valina

Arg.- Arginina

Leu.- Leucina

Iso.- Isoleucina

His.- Histidina

Fen.- Fenilalanina

Ser.- Serina

Gln.- Glutamina

kg.- Kilogramo

ml.- Mililitro

μl.- Microlitro

h.- Horas

ÍNDICE DE CONTENIDO

Agradecimientos.....	iii
Dedicatoria	iv
Abreviaturas	v
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS.....	2
3. OBJETIVO	3
3.1. Objetivos específicos.....	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1. Importancia de los aminoácidos en la nutrición porcina	4
4.1.1. Aminoácidos	4
4.1.2. Metionina como AA funcional.....	4
4.2. Intestino delgado	7
4.3. Digestión y absorción de los aminoácidos.....	8
4.4. Transportadores de aminoácidos	10
4.4.1. Características.....	10
4.4.2. Sistema transportador B ⁰	12
4.4.3. Sistema transportador b ⁰⁺	12
4.4.4. Sistema transportador y+L.....	13
4.4.5. Mecanismo de acción	13
4.5. Estrés por calor en cerdos.....	14
4.6. Efectos del estrés por calor en el intestino delgado	16
4.7. Efectos del estrés por calor sobre los transportadores de aminoácidos	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1. Generalidades	19
5.2. Animales y manejo	20
5.3. Dietas experimentales	21
5.4. Colecta de sangre	23

5.5. Sacrificio y toma de muestras	23
5.6. Análisis en laboratorio	24
5.6.1. Extracción y purificación total de ARN	24
5.6.2. Transcripción reversa	24
5.6.3. PCR cuantitativa	25
5.7. Análisis de aminoácidos en suero	27
5.8. Análisis estadístico	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1. Temperatura ambiental, humedad relativa e índice temperatura humedad	28
6.2. Constantes fisiológicas: temperatura corporal, temperatura intestinal y frecuencia respiratoria.....	29
6.3. Comportamiento productivo	31
6.4. Expresión génica de transportadores de aminoácidos	33
6.5. Consumo y concentración de aminoácidos en suero	37
6.6. Concentración de metabolitos en suero	44
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	54
9. LITERATURA CITADA.....	55

Índice de cuadros

Cuadro 1. Proteínas transportadoras de aminoácidos en mamíferos.....	11
Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales* (%).	22
Cuadro 3. Composición analizada de los AA de las dietas experimentales (%).	23
Cuadro 4. Oligonucleótidos específicos para genes transportadores de AA y gen de referencia RPL4.	26
Cuadro 5. Parámetros de comportamiento productivo de los cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y en estrés por calor alimentados con la dieta testigo (EC100) o con la adición del 120, 140, 160% de metionina (EC120, EC140, EC160).....	32
Cuadro 6. Análisis del Dct de la expresión del ARNm de los transportadores de aminoácidos B ⁰ , b ^{0,+} , y+L en intestino delgado de cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y en estrés por calor alimentados con la dieta testigo (EC100) o con la adición del 120, 140, 160% de metionina (EC120, EC140, EC160).....	36
Cuadro 7. Consumo diario (g/d) de AA esenciales en cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y en estrés por calor alimentados con la dieta testigo (EC100) o con la adición del 120, 140, 160% de metionina (EC120, EC140, EC160).....	38
Cuadro 8. Concentración (µg/mL) de AA esenciales en suero de cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y en estrés por calor alimentados con la dieta testigo (EC100) o con la adición del 120, 140 y 160% de metionina (E120, EC140, EC160).	40
Cuadro 9. Concentración (µg/mL) de AA no esenciales en suero de cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y estrés por calor alimentados con la dieta testigo (TN100) o con la adición del 120, 140 y 160% de metionina (EC120, EC140, EC160).....	42
Cuadro 10. Coeficientes de correlación de Pearson entre el consumo diario y la concentración sérica de aminoácidos esenciales.....	43

Cuadro 11. Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de metabolitos en suero de cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y en estrés por calor, alimentados con la dieta testigo (EC100) o con la adición del 120, 140 y 160% de metionina (EC120, EC140, EC160)..... 45

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de absorción y transporte transmembrana de aminoácidos y péptidos por la columna intestinal, célula epitelial: enterocito (Adaptado de Krehbiel y Matthews, 2003).	8
Figura 2. Transporte de aminoácidos transmembrana en enterocito del epitelio intestinal (Mastrototaro et al., 2016).	14
Figura 3. Índice Temperatura-Humedad (ITH) (basado en Thom, 1959) y categorías del índice de seguridad climática (LWSI; LCI, 1970), citado en Hahn et al. (2009).....	15
Figura 4. Temperatura ambiental (°C) y humedad relativa (%) en la sala EC y TN.....	28
Figura 5. Índice Temperatura Humedad en sala a temperatura ambiente (estrés por calor).	29
Figura 6. Temperatura corporal (TC), temperatura intestinal (TI) en cerdos en EC y TC en cerdos en condiciones de termoneutralidad (TN).....	30
Figura 7. Frecuencia respiratoria en cerdos en estrés por calor y termoneutralidad. Contrastes: C1= EC100 vs TN100, C2= EC100 vs EC120-140-160, C3= EC120-140-160 vs TN100.	31
Figura 8. Expresión relativa al tratamiento TN100 de los transportadores de aminoácidos B ⁰ , b ^{0,+} , y+L en yeyuno (A) e íleon (B) de los cerdos en condiciones termoneutrales o en EC alimentados con dietas enriquecidas con metionina.	34
Figura 9. Expresión relativa al tratamiento EC100 de los transportadores de aminoácidos B ⁰ , b ^{0,+} , y+L en yeyuno (A) e íleon (B) de los cerdos en condiciones termoneutrales o en EC alimentados con dietas enriquecidas con metionina.	35

RESUMEN

El estrés por calor (EC) reduce el consumo de alimento y en consecuencia la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento animal, incrementado la demanda de aminoácidos. Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la adición de diferentes niveles de metionina (DL-Met) a dietas para cerdos en estrés por calor sobre su comportamiento productivo, expresión de transportadores de aminoácidos en intestino delgado y concentración sérica (CS) de aminoácidos. Se utilizaron 60 cerdos de 23 ± 1 kg, distribuidos en cinco tratamientos: T1, TN100 (termoneutralidad, dieta testigo); T2, EC100 (EC, dieta testigo); T3, EC120 (EC, dieta con 120 % del requerimiento de Met); T4, EC140 (EC, dieta con 140 % del requerimiento de Met) y T5, EC160 (EC, dieta con 160% del requerimiento de Met). El alimento y agua se proporcionaron *ad libitum*, al día 18 se tomaron muestras de sangre y al final del periodo experimental (d21) los cerdos fueron sacrificados para obtener muestras de mucosa intestinal (yeyuno e íleon). La temperatura ambiental fluctuó entre 27.9-35.6 °C. No hubo diferencias ($P > 0.05$) en el consumo de alimento entre tratamientos, sin embargo, la ganancia diaria de peso se incrementó ($P < 0.05$) en los cerdos en condiciones de EC, mejorando ($P < 0.05$) la relación G:C con la adición de 20, 40 y 60% más de Met a la dieta. En yeyuno, la expresión relativa del transportador B^0 no fue diferente entre tratamientos, la expresión de $b_{0,+}$ fue mayor ($P < 0.05$) con el tratamiento EC140. En íleon, la expresión de B^0 fue menor ($P < 0.05$) en todos los tratamientos en EC en comparación al tratamiento TN100, la expresión de $b_{0,+}$ y $y+L$ no fue diferente entre tratamientos. La CS de Met incrementó linealmente ($P < 0.05$); la CS de Lis, Tre, Val, Leu, Iso, His y Fen fue menor ($P < 0.05$) en los cerdos en EC alimentados con las dietas enriquecidas con Met. Estos resultados indican que la adición extra de Met permite la recuperación de la ganancia diaria de peso y mejora la eficiencia alimenticia que se refleja en una mayor disponibilidad de los aminoácidos esenciales y además afecta la expresión del transportador $b^{0,+}$ en yeyuno de los cerdos en EC.

Palabras clave: Metionina, Estrés por calor, Transportadores, Aminoácidos, Cerdos

ABSTRACT

Heat stress (HS) reduces the voluntary feed intake and consequently the availability of nutrients for animal growth and increase the demand for amino acids. An experiment was conducted out to evaluate the effect of the addition of different levels of methionine (DL-Met) to diets for pigs under heat stress on the performance, expression of amino acid transporter in the small intestine and serum concentration (SC) of amino acids. Sixty 23 ± 1 kg BW pigs were used, distributed in five treatments: T1, TN100 (thermoneutrality, control diet); T2, HS100 (HS, control diet); T3, HS120 (HS, diet with 120 % of Met requirement); T4, HS140 (HS, diet with 140% of Met requirement) and T5, HS160 (HS, diet with 160% of Met requirement). Food and water were ad libitum, blood samples were collected on day 18 and at the end of the experimental period (d21) pigs were sacrificed to obtain intestinal mucosa samples (jejunum and ileum). The ambient temperature fluctuated between 27.9-35.6 ° C. There were no differences ($P > 0.05$) in the voluntary feed intake between treatments, however, daily weight gain increased ($P < 0.05$) in pigs under HS conditions and the G:F improved ($P < 0.05$) with the addition of 20, 40 and 60% more Met to the diet. In jejunum, the relative expression of B⁰ did not differ between treatments, the expression of b_{0,+} was higher ($P < 0.05$) with the HS140 treatment. In ileum, the expression of B⁰ was lower ($P < 0.05$) in all treatments in HS compared to treatment TN100, the expression of b_{0,+} and y+L was not differed between treatments. The SC of Met increased linearly ($P < 0.05$); the SC of Lys, Thr, Val, Leu, Ile, His and Phe was lower ($P < 0.05$) in the HS pigs fed the Met-enriched diets. These results indicate that, extra addition of Met allows the recovery of daily weight gain and improves feed efficiency, which is reflected in a higher availability of essential amino acids and also affects the expression of the b_{0,+} transporter in the jejunum of pigs in HS.

Keywords: Methionine, Heat stress, Transporters, Amino acids, Pigs

1. INTRODUCCIÓN

El estrés por calor se manifiesta en los organismos que habitan zonas con elevada temperatura ambiental y humedad relativa (Bernabucci, 2012). Como resultado de estas condiciones se afectan de manera importante tanto el bienestar y la producción de los animales (Baumgard y Rhoads, 2013). Así también, es importante considerar que las predicciones del cambio climático proyectan un aumento de la temperatura ambiental a lo largo de los años, lo que provocará mayor estrés y pérdidas importantes en la producción animal (Oliveira et al., 2019).

A nivel fisiológico, los animales en condiciones de estrés por calor presentan incrementos en sus constantes fisiológicas como frecuencia respiratoria (Patience et al., 2005), frecuencia cardíaca, y temperatura corporal (Wilson y Crandall, 2011). Además, reducen su consumo voluntario de alimento (Ross et al., 2015). Lo anterior se traduce en una reducción en el consumo y disponibilidad de nutrientes específicos como aminoácidos y glucosa esenciales para el crecimiento y producción (Baumgard y Rhoads, 2013). Los cerdos son muy sensibles al estrés por calor, y se ha evidenciado que pueden presentar daños en la mucosa intestinal, específicamente sobre las vellosidades intestinales (Pearce et al., 2014), lo que podría traducirse en menor abundancia de transportadores de nutrientes (Morales et al., 2014).

En la búsqueda de alternativas para contrarrestar esos efectos, se propuso enriquecer las dietas de los cerdos en condiciones de estrés por calor con aminoácidos libres como metionina (Morales et al., 2018), ya que es un aminoácido esencial y limitante en dietas para cerdos (Chen et al., 2014), con funciones antioxidantes (Wu, 2009). Por lo anterior, se espera que enriquecer con metionina la dieta de los cerdos en estrés por calor mejore sus parámetros productivos, a través reducir el daño a epitelio intestinal e incremente la absorción y disponibilidad de aminoácidos para el crecimiento.

2. HIPÓTESIS

La adición de metionina (DL-Met) a dietas para cerdos en estrés por calor, mejora el comportamiento productivo debido a un ajuste en la expresión de transportadores de aminoácidos en intestino delgado e incremento en la disponibilidad de aminoácidos en suero destinados al crecimiento del animal.

3. OBJETIVO

Evaluar el efecto de la adición de metionina (DL-Met) a dietas para cerdos en estrés por calor, sobre el comportamiento productivo, concentración sérica de aminoácidos y expresión de transportadores de aminoácidos en intestino delgado.

3.1. Objetivos específicos

- Evaluar el consumo de alimento, ganancia diaria de peso y relación ganancia de peso: consumo de alimento de los cerdos en estrés por calor alimentados con dietas adicionadas con distintos niveles de metionina.
- Analizar la expresión de los transportadores de aminoácidos ($b^{0,+}$, B^0 , $y+L$) en el intestino delgado de cerdos en condiciones de estrés por calor alimentados con dietas adicionadas con distintos niveles de metionina.
- Analizar la concentración sérica de aminoácidos y metabolitos en cerdos en estrés por calor alimentados con dietas adicionadas con distintos niveles de metionina.
- Determinar las constantes fisiológicas: temperatura corporal e intestinal y frecuencia respiratoria de los cerdos en estrés por calor alimentados con dietas adicionadas con distintos niveles de metionina.
- Determinar el nivel de suplementación de metionina en las dietas para cerdos en estrés por calor que permita lograr un óptimo comportamiento productivo.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Importancia de los aminoácidos en la nutrición porcina

4.1.1. Aminoácidos

Los aminoácidos (AA) son compuestos orgánicos, que se caracterizan por tener en su estructura un grupo carboxilo (-COOH), un grupo amino (-NH₂), adheridos ambos al carbono α de una cadena carbonada o cadena lateral R (McDonald, 2013). Existen alrededor de 300 aminoácidos en la naturaleza, pero solo 20 están codificados por el ADN para aparecer en las proteínas (Taniguchi, 2008).

Los aminoácidos se clasifican como esenciales y no esenciales, los primeros son aquellos que no se sintetizan o son sintetizados en cantidades insuficientes por el organismo (Lewis y Southern, 2001; Wu, 2009) y deben proporcionarse en la dieta para cubrir los requerimientos de los animales (Wu, 2009), para lograr un crecimiento normal y permitir otras funciones relacionadas con la producción (Pond et al., 2012). Los AA no esenciales son aquellos que sí se sintetizan en cantidades suficientes para cubrir los requerimientos del organismo (Lewis y Southern, 2001).

Los AA esenciales para animales superiores son: lisina, histidina, leucina, isoleucina, valina, metionina, treonina, triptófano y fenilalanina (D'Mello, 2003); arginina se considera como aminoácido esencial para cerdos en crecimiento (NRC, 2012). Los AA constituyen las unidades estructurales de las proteínas que forman el tejido muscular y compuestos no proteicos como hormonas, neurotransmisores, inmunoglobulinas y otros péptidos bioactivos (Kyriazakis y Whittemore, 2006). Por lo tanto los AA se requieren para funciones de mantenimiento y producción animal y sus deficiencias entonces, tendrán un impacto en la producción de carne, leche etc. (D'Mello, 2003).

4.1.2. Metionina como AA funcional

Metionina (Met) es un aminoácido esencial alifático que contiene azufre y es precursor de cisteína, S-adenosil-metionina, succinil-CoA, homocisteína y carnitina (Martínez et al., 2017). S-adenosilmetionina es un donador de grupos metilo que participa en el metabolismo de las poliaminas, la creatina y la fosfatidilcolina:

fosfolípido de la membrana celular (Bauchart-Thevret et al., 2009; Blachier et al., 2013).

Metionina puede regular los procesos metabólicos, el sistema inmune innato, el funcionamiento digestivo en mamíferos, interviene en el metabolismo de lípidos (Martínez et al., 2017) y en la síntesis de taurina la cual tiene función antioxidante, osmorregulación, funciones vasculares y musculares, cardíacas, antiinflamatorio y conjugación con ácidos biliares (Wu, 2013). Met es un componente de prácticamente todas las proteínas y péptidos sintetizados en el organismo (Kohlmeier, 2015).

Metionina participa en la biosíntesis de glutatión a partir de cisteína para contrarrestar el estrés oxidativo (Martínez et al., 2017). Metionina es un aminoácido sensible a la oxidación formando sulfóxidos de metionina, estos productos pueden repararse fácilmente mediante diversas metioninas sulfóxido reductasas dependientes de NADPH; Met es también el principal antioxidante en la membrana mitocondrial interna de la célula. (Schindeldecker y Moosmann, 2015).

Metionina se une al ATP y forma S-adenosilmetionina, mediante transmetilación S-adenosilmetionina dona un grupo metilo a un aceptor, formando S-adenosilhomocisteína este compuesto es hidrolizado a homocisteína y adenosina (Lewis, 2003), la homocisteína se puede catabolizar a cisteína mediante transulfuración y también puede utilizarse para volver a sintetizar Met mediante una nueva metilación (Riedijk et al., 2007; Mastrototaro et al., 2016). En ingestas excesivas de Met, mediante transaminación se producen iones SO_4^{2-} que se excretan a través de riñón (Mastrototaro et al., 2016).

El intestino y el hígado son los principales órganos implicados en la utilización de metionina dietética para la síntesis de cisteína (Zhang et al., 2015), Met es metabolizado en aproximadamente 20-30% durante la absorción (Martínez et al., 2017). Se ha demostrado que la Met utilizada por el tracto gastrointestinal se metaboliza en homocisteína (31%) y proteína tisular (29%); en lechones se ha reportado la utilización del 20% de Met de la dieta en el tracto gastrointestinal (Riedijk et al., 2007). Al igual que el resto de AA esenciales la deficiencia de Met

causa retraso en el crecimiento, pérdida de masa muscular y daño en órganos (Kohlmeier, 2015).

Desde hace mucho tiempo este AA se sintetiza de manera artificial y se utiliza como suplemento alimenticio para humanos (Mastrototaro et al., 2016). En producción animal metionina es el tercer aminoácido limitante en las dietas porcinas (Zhang et al., 2019) y su utilización en forma libre en las dietas es muy común, sin embargo, el nivel ideal de este aminoácido sigue siendo muy controvertido (Oltjen et al., 2013).

La forma D-Met es utilizada por la mayoría de las especies, puede reemplazar directamente la forma L para cumplir con el requerimiento de metionina (Lewis y Southern, 2001). Cualquier D-Met ingerida debe convertirse en L-Met para ser utilizada en la síntesis de proteínas y para el metabolismo (Tian et al., 2016), la conversión consiste en la desaminación oxidativa al α -ceto ácido (ácido 2-ceto-4-(metiltiol) butírico) y transaminación de un grupo amino a partir de glutamato (Lewis, 2003).

La conversión de D-Met a L-Met no es un factor limitante debido a la existencia de D-aminoácido oxidasa con actividad en diferentes tejidos, como riñón, hígado, estómago, duodeno, yeyuno e íleon, de cerdos (Tian et al., 2016; H. Zhang et al., 2019). Las fuentes de metionina de grado alimenticio están disponibles como DL-Met (99% puro) y como hidroxianálogo de Met (líquido que contiene 88% de metionina) (Lewis y Southern, 2001). DL-Met y L-Met tienen equivalentes nutricionales (Lewis, 2003).

Metionina se absorbe eficientemente en el intestino delgado ya que existen varios transportadores que facilitan su absorción en el enterocito; y como tiene carga neutra utiliza sistemas de transporte para aminoácidos neutros (Mastrototaro et al., 2016). Met es absorbido por transportadores independientes de Na^+ : b^0AT , LAT 1/2, Lat 4 y transportadores dependientes de Na^+ : $\text{B}^0\text{AT1}$, ATB^0+ , ASCT2, SNAT 1/2, y+LAT 1/2 e Imino (S. Zhang et al., 2015; Mastrototaro et al., 2016). Las características de algunos de estos transportadores se describen más adelante.

4.2. Intestino delgado

El intestino delgado está dividido en tres secciones muy similares anatómicamente, duodeno, yeyuno e íleon (Kong et al., 2018). En cerdos en crecimiento el intestino puede medir 16 a 21m de largo, 4 a 5% es duodeno, 88 a 91% corresponde a yeyuno y 4 a 5% corresponde a íleon (Yen, 2000). Duodeno es el sitio primario de digestión y absorción de nutrientes, recibe alimentos parcialmente digeridos (Kong et al., 2018) que se mezclan con las secreciones del hígado y páncreas. Los jugos biliares, canalizan hacia el duodeno en una papila de 2 a 5 cm del píloro del estómago, y el jugo pancreático ingresa al intestino en una papila de 12 a 20 cm posterior a la entrada de la bilis (Yen, 2000).

El yeyuno se encuentra en la sección media del intestino contiene pliegues circulares y vellosidades para aumentar el área de absorción de nutrientes que fueron digeridas en duodeno (Kong et al., 2018). El íleon se distingue por sus capas musculares ligeramente más gruesas y la unión con el intestino grueso (Yen, 2000); absorbe vitamina B12, ácidos biliares y otros nutrientes no absorbidos por yeyuno (Kong et al., 2018).

La pared del intestino delgado está formada por cuatro capas: mucosa, submucosa, capa muscular y adventicia (Kong et al., 2018). La mucosa se conforma de mucosa muscular, lamina propia y epitelio (Yen, 2000), la capa epitelial es una lámina continua de células que cubre las vellosidades (proyecciones en forma de dedo con criptas de Lieberkühn circundantes) para formar la superficie luminal del intestino (Kitt et al., 2001). La longitud de las vellosidades es mayor en duodeno hasta la mitad de yeyuno y luego disminuye hasta íleon (Yen, 2000).

Existen al menos 5 tipos de células del epitelio: enterocitos, células caliciformes, células de Paneth y células enteroendócrinas (Mejías et al., 2019), todas se originan en las células madre en la base de las criptas (Yen, 2000). Los enterocitos son las células más abundantes, responsables de la absorción de productos de la digestión y liberan enzimas (Mejías et al., 2019). La membrana apical del enterocito cubre su superficie frente a la luz intestinal y tiene microvellosidades que aumentan el área de absorción, la membrana basal cubre la superficie del enterocito frente a los

capilares sanguíneos y existe un espacio lateral entre los enterocitos (Wu, 2013). Las células caliciformes de la mucosa secretan moco como un fluido protector grueso y mantienen la humedad del tejido (Mejías et al., 2019).

4.3. Digestión y absorción de los aminoácidos

La digestión se define como la desintegración química de los alimentos en el tracto digestivo en moléculas más pequeñas, posteriormente estos nutrientes son absorbidos en intestino con la finalidad de que éstos se encuentren disponibles y viajen en sangre hacia el resto de los tejidos del organismo (Wu, 2013), el proceso general se describe a continuación y se resume en la Figura 1.

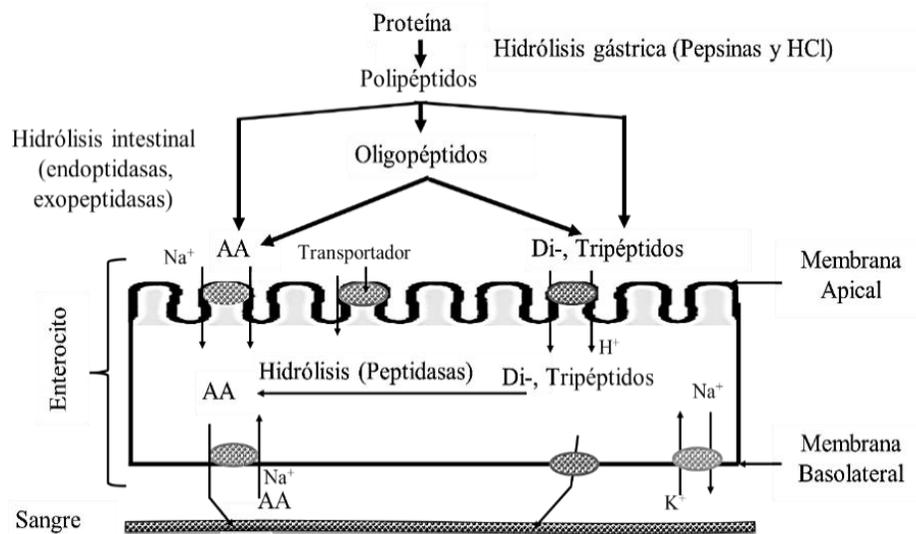


Figura 1. Mecanismo de absorción y transporte transmembrana de aminoácidos y péptidos por la columna intestinal, célula epitelial: enterocito (Adaptado de Krehbiel y Matthews, 2003).

En gran medida, la función del tracto gastrointestinal es mecánica, el alimento recibido del esófago pasa al estómago donde inicia la digestión de las proteínas del alimento (Blachier et al., 2013). En estómago se secreta ácido clorhídrico (HCl) por las células parietales gástricas, el HCl inicia la conversión de pepsinógenos (Krehbiel y Matthews, 2003) en varias proteasas endógenas (pepsinas A, B y C) y

mantiene la actividad de estas enzimas (Tajima y Aminov, 2015). La pepsina es la principal enzima hidrolítica en el estómago de cerdos en crecimiento y adultos (Yen, 2000), una vez secretada, es activada a pH ácido (< 5.0), y su actividad consiste en romper la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína formando fragmentos peptídicos; polipéptidos, con 10-50 AA (Krehbriel y Matthews, 2003).

Los productos obtenidos de la hidrólisis con pepsinas, ingresan a duodeno a través del esfínter pilórico donde continúa la digestión en la luz intestinal mediante proteasas gástricas y pancreáticas (Krehbriel y Matthews, 2003). Las proteasas incluyen un grupo de endopeptidasas tales como tripsina, quimotripsina, y elastasa, además de las exopeptidasas: carboxipeptidasa A y B y aminopeptidasas (Ganapathy, 2012), la digestión ocurre en un medio alcalino debido a las sales biliares, jugo pancreático y secreciones duodenales (Wu, 2013).

De la hidrólisis peptídica se obtienen 20-30% de aminoácidos libres, 70-75% de oligopéptidos formados por menos de 10 AA; dipéptidos, dos AA y tripéptidos, tres AA (Ganapathy, 2012; Goodman, 2010; Yen, 2000); estos productos se absorben desde duodeno, pero yeyuno es el sitio principal para la absorción de péptidos pequeños y AA libres, seguido por íleon (Wu, 2013). Los oligopéptidos de más de tres aminoácidos son hidrolizados en la luz intestinal mediante las peptidasas de la región apical del enterocito (Emery, 2012).

Los productos obtenidos (AA) ingresan a los enterocitos mediante transportadores de la membrana apical y salen a través de transportadores de la membrana basal., los dipéptidos y tripéptidos se descomponen en la región apical del enterocito (Wu, 2013) o son sujetos a hidrólisis dentro de la célula por las peptidasas citoplasmáticas generando aminoácidos libres (Emery, 2012); sin embargo, pueden ser absorbidos intactos y transportados en el enterocito por un único transportador acoplado con H⁺ (Krehbriel y Matthews, 2003).

Los destinos intracelulares de los AA después del transporte en la membrana de los enterocitos incluyen: el metabolismo; síntesis de proteínas *in situ* (peptidasas, apoproteínas, mucinas; flujo de retorno a la luz intestinal a cambio de la entrada de AA lumbinales; y flujo de salida a la sangre portal a través de la membrana basal

(Trottier y Manjarín, 2012). En cerdos, al parecer todos los péptidos son hidrolizados en el citoplasma y ningún péptido aparece intacto en la sangre portal (Yen, 2000). Aproximadamente el 85% de los AA absorbidos aparecen en la sangre portal hepática como AA libres (Ganapathy, 2012; Krehbriel y Matthews, 2003).

4.4. Transportadores de aminoácidos

4.4.1. Características

Los transportadores de AA (Cuadro 1) son proteínas ubicadas en la membrana apical y basal del enterocito, responsables de transportar los AA a través de la membrana (Bröer, 2008). Estos transportan AA desde la luz intestinal hacia el citoplasma; posteriormente otro transportador situado en la membrana basolateral transporta el o los AA hacia el espacio capilar, para su llegada a la circulación sanguínea (Trottier y Manjarín, 2012). Los sistemas de transporte de aminoácidos se clasifican como dependientes e independientes de Na⁺, según la especificidad del sustrato y mecanismo de transporte (Hyde et al., 2003). Además, al nombre de cada sistema se le adicionan los superíndices 0, +, y 0+ para describir la naturaleza eléctrica de los aminoácidos reconocidos como sustrato para cada sistema (0, AA neutros; +, AA catiónicos; 0+, AA catiónicos y neutros; Bröer, 2008). Existen 6 transportadores de AA aniónicos (ácido glutámico y ácido aspártico); 4 transportadores para AA catiónicos (lisina, arginina e histidina); 11 para AA neutros (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, triptófano, treonina, tirosina, serina, cisteína, glutamina y asparagina) y 5 que transportan AA neutros y catiónicos, prolina cuenta con un transporte exclusivo: sistema IMINO (Krehbriel y Matthews, 2003). Existe un subconjunto de transportadores que funcionan con una de dos glucoproteínas la 4F2hc y rBAT, ambas activan los sistemas de transporte (Krehbriel y Matthews, 2003).

Cuadro 1. Proteínas transportadoras de aminoácidos en mamíferos.

Transportador	Sistema transportador ¹	Sustrato específico ²	Lugar de acción ³	Epitelios evaluados
AA aniónicos				
EAAT2, EAAT3,	X_{AG}⁻ D-Na ⁺	D L-E	MA	Yeyuno e íleon
4F2hc/xCT	X_C⁻ I-Na ⁺	L- C, O, L-D	NR	Intestino
AA catiónicos				
CAT-1	y⁺ I-Na ⁺	K, R, O, H	MA y MB	Intestino delgado
AA neutros				
SNAT2	A D-Na ⁺	Q, N, H, A, M, S, G, P	MB	Intestino delgado
ASCT2	ASC D-Na ⁺	A, S, C, T, Q	MA	Intestino
B ⁰ AT1	B⁰ D-Na ⁺	Todos los AA ⁰	MA	Intestino
4F2hc/LAT1	L I-Na ⁺	H, M, L, I, V, F, Y, W Todos los AA ⁰ , excepto P	MB	Intestino delgado
4F2hc/LAT2				
TAT1	T I-Na ⁺	L-: Y, W, F D-: W, F	MB	Yeyuno e íleon
SIT1	IMINO D-Na ⁺	P, iminoácidos	MA	Intestino
AA neutros-catiónicos				
ATB ^{0,+}	B^{0,+} D-Na ⁺	K, R, A, S, C, T, N, Q, H, M, I, L, V, F, Y, W, β-A	MA	Íleon distal
rBAT/b ^{0,+} AT	b^{0,+} I-Na ⁺	R, K, O, C, Q, H, M, R, L, F, Y, I, V, T, N, W, S, A,	MA	Yeyuno e íleon Intercambiador de AA
4F2hc/y+LAT1	y+L I-Na ⁺ para AA ⁺ D-Na ⁺ para AA ⁰	K, R, Q, H, M, L K, R, Q, H, M, L, A, C	MB	Intestino delgado Intercambiador de AA
4F2hc/y+LAT2				

Adaptado de Hyde et al., 2003; Krehbriel y Matthews, 2003; Bröer, 2008; Ganapathy, 2012; Wu, 2013. ¹I-Na⁺: Independiente de sodio; D-Na⁺: Dependiente de sodio. ²AA: Lisina (L), Arginina (R), Histidina (H), Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Cisteína (C), Valina (V), Serina (S), Glicina (G), Alanina (A), Fenilalanina (F), Triptófano (W), Tirosina (Y), Treonina (T), Glutamina (Q), Asparagina (N), Prolina (P), Aspartato (D), Glutamato (E) y Ornitina (O), β-A (Beta alanina). ³MA: membrana apical de la célula; MB: membrana basolateral de la célula.

A continuación, se describen 3 sistemas transportadores de AA que se encargan del transporte de lisina, treonina, metionina, triptófano y valina que son aminoácidos limitantes en las dietas de cerdos en crecimiento (Lewis, 2003; NRC,2012), por lo tanto, su absorción eficiente en el intestino delgado es importante.

4.4.2. Sistema transportador B^0

El sistema B^0 es el principal sistema de transporte de aminoácidos neutros que se encuentra en la membrana apical del enterocito (Bröer, 2008) y está caracterizado por ser de alta capacidad y dependiente de Na^+ (Boudko et al., 2005). El gradiente de Na^+ dirigido al interior de la célula y el potencial de membrana negativo proporcionan la fuerza impulsora para este sistema que acepta todos los aminoácidos neutros que poseen el grupo amino en la posición α (Ganapathy, 2012). B^0 se expresa en los enterocitos del intestino delgado y en las células del epitelio renal (Bröer, 2008). La ectopeptidasa conocida como enzima convertidora de angiotensina 2(ACE2) está asociada con B^0 ; esta carboxipeptidasa se ubica en la membrana apical del enterocito y es necesaria para el apropiado reclutamiento de B^0 , ACE2 hidroliza aminoácidos neutros a partir del carboxilo terminal de los péptidos presentes en el lumen del intestino y los aminoácidos liberados sirven como sustrato para B^0 (Camargo et al., 2009; Ganapathy, 2012).

4.4.3. Sistema transportador $b^{0,+}$

El sistema $b^{0,+}$ o $b^{0,+}$ AT, es un sistema de transporte de alta afinidad, independiente de Na^+ , que transporta AA neutros y catiónicos en los enterocitos (Ganapathy, 2012) y riñones (Palacín et al., 2001). El $b^{0,+}$ es una proteína, compuesta de 487 aminoácidos y con masa molecular 50 kDa (Krehbriel y Matthews, 2003). El transportador $b^{0,+}$ es capaz de transportar el aminoácido cistina que forma puentes disulfuro C-S-S-C (Ganapathy, 2012). Este sistema funciona como un heterodímero que consta de dos proteínas diferentes, la subunidad pesada relacionada con la glucoproteína rBTA que se localiza en la membrana apical de los enterocitos y en las células epiteliales de la nefrona (Palacín et al., 2001). El transportador $b^{0,+}$ funciona como un intercambiador de AA obligado, la absorción de aminoácidos catiónicos y cistina a través de este sistema se combina con la liberación de AA

neutros en la luz intestinal (Ganapathy, 2012). En cerdos se ha confirmado la expresión en duodeno, yeyuno e íleon, así como en colon (Trottier y Manjarín, 2012).

4.4.4. Sistema transportador y+L

El sistema y+L funciona como un intercambiador independiente de Na^+ para AA catiónicos y como dependiente de Na^+ para AA neutros (Krehbriel y Matthews, 2003). Este tipo de transportadores importan selectivamente ciertos AA a cambio de la exportación de otros AA seleccionados, con un mecanismo de intercambio 1:1 (Boudko et al., 2005). Este sistema de transporte en la membrana basolateral regula la entrada de aminoácidos neutros de la sangre a los enterocitos acoplándose a Na^+ y la salida de los aminoácidos catiónicos hacia sangre (Ganapathy, 2012). El sistema y+L intercambia aminoácidos de manera obligatoria y comprende dos isoformas, cada una funciona como heterodímero (Krehbriel y Matthews, 2003). Los transportadores de aminoácidos y+LAT1-4F2hc y y+LAT2-4F2hc exhiben mayor actividad transportadora, y+LAT1 se expresa en niveles altos en la corteza renal y el intestino, es el intercambiador de AA catiónicos en la membrana basolateral (Pfeiffer et al., 1999).

4.4.5. Mecanismo de acción

La concentración intracelular de aminoácidos es generalmente más alta que (o al menos igual que) en el líquido extracelular (Hyde et al., 2003). Para el transporte de aminoácidos transmembrana es necesario que la célula mantenga la concentración adecuada de ciertos elementos (Ganapathy, 2012). La bomba Na^+/K^+ ATPasa es un transportador activo primario que ayuda a mantener los gradientes transmembrana de Na^+ y K^+ (Hyde et al., 2003). Los enterocitos absorben los AA libres en la luz intestinal, utilizando transportadores (Figura 2) que no requieren Na^+ (difusión facilitada), y transportadores dependientes de Na^+ o transportadores activos secundarios (Hyde et al., 2003). En el caso de transportadores dependientes de Na^+ , el transportador lleva al aminoácido hacia el interior de la célula, este proceso requiere energía (ATP) para la entrada de Na^+ , por lo tanto este tipo de transportadores mueven dos solutos en la misma dirección (Trottier y Manjarín,

2012). Cuando el Na^+ atraviesa la membrana celular libera energía acumulada en su gradiente electroquímico la cual es utilizada para transportar al aminoácido (Ganapathy, 2012). Los intercambiadores de aminoácidos como los sistemas ASC, y+L y L, transportan aminoácidos por mecanismos antiporte donde intercambian la entrada de un aminoácido por la salida de otro aminoácido (Hyde et al., 2003). Los aminoácidos en el citoplasma del enterocito salen a través de transportadores de la membrana basal hacia el torrente sanguíneo (Wu, 2013).

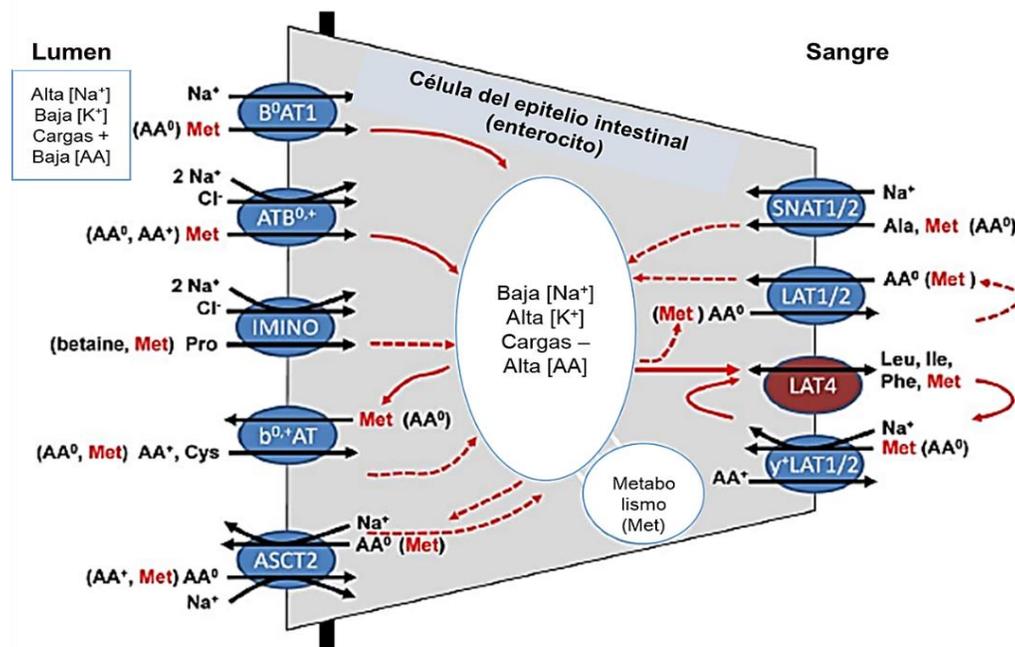


Figura 2. Transporte de aminoácidos transmembrana en enterocito del epitelio intestinal (Mastrototaro et al., 2016).

4.5. Estrés por calor en cerdos

La zona termoneutral se define como el rango de temperatura ambiente sobre el cual, a un nivel fijo de consumo de energía, la producción de calor es mínima y constante (Renaudeau et al., 2012). En el caso de los cerdos, su zona termoneutral o temperatura de confort en etapa de crecimiento (15-30 kg) y finalización (30-60kg) está en el rango de 18 a 21°C, mientras que la temperatura óptima para lechones puede incrementarse hasta 26°C (Kyriazakis y Whittemore, 2006).

La combinación de la temperatura ambiental y humedad relativa permite calcular el índice temperatura-humedad (ITH) (Figura 3)., este índice puede ser utilizado para medir la sensación térmica y el riesgo por las condiciones ambientales a las que está expuesto un animal (Habeeb et al., 2018). De manera que se han establecido rangos de ITH en los que habrá que considerar estar en alerta al cuidado de los animales, o bien éstos podrán entrar en una fase de peligro o emergencia (Xin y Harmon, 1998).

		Humedad relativa %																			
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Temperatura, °C	21	64	64	64	65	65	65	66	66	66	67	67	67	68	68	68	69	69	69	70	70
	22	65	65	65	66	66	67	67	67	68	68	69	69	69	70	70	70	71	71	72	72
	23	66	66	67	67	67	68	68	69	69	70	70	70	71	71	72	72	73	73	74	74
	24	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	72	72	73	73	74	74	75	75	76	76
	26	68	68	69	69	70	70	71	71	72	73	73	74	74	75	75	76	76	77	77	78
	27	69	69	70	70	71	72	72	73	73	74	75	75	76	76	77	78	78	79	79	80
	28	69	70	71	71	72	73	73	74	75	75	76	77	77	78	79	79	80	81	81	82
	29	70	71	72	73	73	74	75	75	76	77	78	78	79	80	80	81	82	83	83	84
	30	71	72	73	74	74	75	76	77	78	78	79	80	81	81	82	83	84	84	85	86
	31	72	73	74	75	76	76	77	78	79	80	81	81	82	83	84	85	86	86	87	88
	32	73	74	75	76	77	78	79	79	80	81	82	83	84	85	86	86	87	88	89	90
	33	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	85	86	87	88	89	90	91	92
	34	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
	36	76	77	78	79	80	81	82	83	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
	37	77	78	79	80	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	93	94	95	96	97	98
	38	78	79	80	82	83	84	85	86	87	88	90	91	92	93	94	95	97	98	99	100
	39	79	80	81	83	84	85	86	87	89	90	91	92	94	95	96	97	98	100	101	102
	40	80	81	82	84	85	86	88	89	90	91	93	94	95	96	98	99	100	101	103	104
	41	81	82	84	85	86	88	89	90	91	93	94	95	97	98	99	101	102	103	105	106
	42	82	83	85	86	87	89	90	92	93	94	96	97	98	100	101	103	104	105	107	108
	43	83	84	86	87	89	90	91	93	94	96	97	99	100	101	103	104	106	107	109	110

Categorías EC asociado con los valores de ITH:
 Normal: ≤ 74 Alerta:75-78 Peligro: 79-83 Emergencia: ≥84

Figura 3. Índice Temperatura-Humedad (ITH) (basado en Thom, 1959) y categorías del índice de seguridad climática (LWSI; LCI, 1970), citado en Hahn et al. (2009).

El resultado de que los animales estén expuestos a un ITH o temperatura ambiental y humedad relativa elevadas, es la presentación de estrés por calor; EC (Baumgard y Rhoads, 2013). El EC se traduce como la serie alteraciones fisiológicas, metabólicas, inmunológicas y de conducta, que afecta su salud y producción (Horowitz et al., 2004). En esta situación los cerdos presentan dificultad para mantener su temperatura corporal, por lo que requieren disipar el exceso de calor mediante el aumento de su frecuencia respiratoria, ya que esta especie no posee

glándulas sudoríparas funcionales, así también activan otros mecanismos para prevenir o mitigar el daño celular y proteger los órganos (Renaudeau et al., 2012) como el corazón (Horowitz et al., 2004) y tejidos gastrointestinales (Cottrell et al., 2015).

Al inicio de un período de exposición al calor, los cerdos presentan incrementada su frecuencia respiratoria y cardíaca (Oliveira et al., 2019; Patience et al., 2005; Patience, 2012). Sin embargo, estas constantes disminuyen gradualmente durante los siguientes días (Renaudeau et al., 2007). Al parecer el impacto del EC se reduce, pero no está claro si esta reducción permanece después de una exposición prolongada (Renaudeau et al., 2010).

Por otro lado, los cerdos en EC ingieren cantidades excesivas de agua lo que incrementa la pérdida de electrolitos provocando una pérdida del equilibrio ácido/base, eventualmente esta condición puede resultar en diarrea o muerte en casos severos (Vandelannoote et al., 2012). En los animales en estrés por calor se observa también una reducción en el consumo de alimento, la cual puede variar dependiendo de la temperatura ambiental (Collin, et al., 2001).

El EC tiene un impacto negativo en el crecimiento muscular asociado, a nivel celular, con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; Montilla et al., 2014). En esta condición se observa reducción en la acumulación de proteínas corporales e incremento de la grasa corporal (Belhadj Slimen et al., 2016). Probablemente esto es resultado de que los animales desvían sus nutrientes y energía para mantener estable su metabolismo (Baumgard y Rhoads, 2013), lo cual compromete su eficiencia productiva en términos de reducción en la ganancia de peso y eficiencia productiva (Zumbach et al., 2008).

4.6. Efectos del estrés por calor en el intestino delgado

El EC tiene un impacto importante a nivel intestinal en cerdos durante los primeros 8-10 días de exposición (Cervantes et al., 2016). Se ha documentado que en EC el flujo sanguíneo se distribuye hacia órganos periféricos en un intento de disipar el

calor, lo que ocasiona una restricción en el aporte de oxígeno y nutrientes a órganos intestinales, lo que afecta directamente a los enterocitos (Ross et al., 2015). En esta condición las células intestinales entran en un estado de estrés oxidativo, debido al incremento en la concentración intracelular de radicales libres (Belhadj Slimen et al., 2016).

Lo anterior compromete la integridad de las membranas celulares, reduce la tasa de proliferación e incrementa la muerte de células de epitelio intestinal, y en consecuencia se observa una reducción en la altura de las vellosidades intestinales de los cerdos expuestos a EC (Liu et al., 2009; Yu et al., 2010; Pearce et al., 2013). El daño a epitelio intestinal también incrementa la permeabilidad del epitelio, lo que aumenta la posibilidad para que toxinas o microorganismos del contenido luminal puedan llegar hacia la sangre portal y causar problemas más serios (Bernabucci, 2012).

4.7. Efectos del estrés por calor sobre los transportadores de aminoácidos

Se especula que la reducción en la altura de vellosidades intestinales observada en cerdos en estrés por calor provoca una reducción en la abundancia de transportadores de aminoácidos, afectando la absorción de estos nutrientes (Cervantes et al., 2016). La expresión génica en el intestino depende de la intensidad y duración de la exposición al EC (Cervantes et al., 2016); por ejemplo, en cerdos expuestos a temperatura ambiente en un rango de 34 a 37°C no se observó efecto del EC en la expresión del transportador $b^{0,+}$ AT en duodeno y yeyuno (Cervantes et al., 2016); sin embargo, en cerdos expuestos a temperaturas extremadamente elevadas (40-45°C) 5 h diarias durante 19 días, se redujo la abundancia de los transportadores $b^{0,+}$ AT en yeyuno, la absorción de arginina también se ve afectada por la menor expresión de este transportador (Morales et al., 2014).

La absorción de lisina es crítica en cerdos en EC al ser el primer AA limitante en las dietas para cerdos, este AA es transportado por sistemas $b^{0,+}$ AT y CAT1 (Majumder

et al., 2009). La reducción en la abundancia de estos transportadores es resultado probable de una disminución en la proliferación de las células intestinales absortivas (Renaudeau et al., 2010). Aunque no hay diferencias en el consumo de alimento, la disponibilidad de lisina en cerdos en EC es menor, alrededor de un 50% respecto a cerdos en confort, este resultado apoya la relación que existe entre la disponibilidad de los aminoácidos y la expresión de los transportadores que permiten su absorción (Morales et al., 2014).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Generalidades

Para esta investigación, el trabajo de campo se realizó en la Unidad de Fisiología y Metabolismo de cerdos y posteriormente el trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Nutrigenómica, ambas unidades pertenecen al Instituto de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicada en Mexicali, Baja California, México.

Por tratarse de un estudio que involucra analizar el efecto del estrés por calor en cerdos en producción, el experimento se llevó a cabo durante la estación más cálida del año: verano (junio-septiembre), cuando la temperatura ambiente (TA) fluctuó diariamente de 20 a 45°C.

Los cerdos se manejaron de acuerdo a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, establecidas por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, 2001).

Dentro de la Unidad de Fisiología y Metabolismo se contó con dos salas, una de las cuales estaba equipada con aire acondicionado, este equipo se encendió para simular condiciones de termoneutralidad (TN) y una sala sin aire acondicionado para los tratamientos en estrés por calor. Dentro de ambas salas se contaba con corrales individuales de piso elevado equipados con comedero y bebedero automático. De acuerdo con el diseño del experimento el alimento se ofreció *ad libitum* o controlado, pero el agua siempre se administró *ad libitum*.

Las condiciones ambientales de las salas, tales como temperatura ambiental (TA) y humedad relativa (HR) se registraron durante el período experimental mediante un higrómetro (Thermotracker Inc.) instalado dentro de cada sala y configurado para registrar estas variables cada 15 min. Los resultados de humedad relativa y temperatura ambiental se emplearon para el cálculo del índice temperatura-humedad (ITH) de acuerdo con la fórmula reportada por NWS (Rothfusz, 1990):

$$\text{ITH} = [(1.8 \cdot T) + 32] - (0.55 \cdot (\text{HR}/100)) \cdot (((1.8 \cdot T) + 32) - 58).$$

5.2. Animales y manejo

El experimento se llevó a cabo en dos periodos de 21 días, en cada periodo se utilizaron 30 cerdos cruzados (Landrace x Hampshire x Duroc), con un peso inicial promedio de 23 ± 1 kg, para un total de 60 cerdos. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar, en cada periodo los cerdos se distribuyeron en cinco grupos según el peso inicial, sexo, edad y camada, cuatro grupos fueron alojados en condiciones de estrés por calor y un grupo se alojó en condiciones termoneutrales, para tener un total de 12 repeticiones por tratamiento, correspondiente a los dos periodos.

Los cerdos en condiciones de estrés por calor se alojaron en la sala que no tenía equipo de aire acondicionado para regular la temperatura ambiente, en esta sala se contaba con corrales individuales de 0.6 x 1.2 m. Los cerdos en condiciones termoneutrales se alojaron en la sala con temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), en corrales individuales de 1.2 x 1.2 m.

A tres cerdos de cada tratamiento se les implantó por vía subcutánea un termógrafo para registrar la temperatura corporal (TC) cada 5 minutos, a los 21 días cuando finalizó la fase experimental se recuperaron los termógrafos para descargar, procesar y analizar los datos de TC. La frecuencia respiratoria (FR) se registró dos veces al día a las 0700 h y 1700 h, durante dos días, en la última semana del experimento. La FR se calculó contando el número de expansiones del tórax resultado de la inspiración, durante un minuto.

Se registró diariamente la cantidad de alimento ofrecido y rechazado, los cerdos se pesaron cada semana. Los datos registrados se utilizaron para el cálculo de consumo diario de alimento (CDA), ganancia diaria de peso (GDP) y relación ganancia de peso: consumo de alimento (G:C).

5.3. Dietas experimentales

La dieta testigo se formuló a base de trigo y pasta de soya, y se utilizaron lisina, treonina y valina libres para cubrir al menos 120 % de los requerimientos de AA establecidos por el NRC (2012) para cerdos en el rango de peso corporal de 25-50 kg, todas las dietas contenían los mismos niveles de AA, con excepción de metionina. Los cerdos se distribuyeron de forma aleatoria en las 4 dietas. Los tratamientos fueron: 1) TN100: cerdos en condiciones termoneutrales que recibieron la dieta testigo (Met100), con el 100% de los requerimientos de Met; 2) EC100: cerdos en estrés por calor que recibieron la dieta testigo; 3) EC120: cerdos en estrés por calor que recibieron una dieta con 20% extra de los requerimientos de Met (Met120); 4) EC140: cerdos en estrés por calor que recibieron una dieta con 40% extra de los requerimientos de Met (Met140) y 5) EC160: cerdos en estrés por calor que recibieron una dieta con 60% extra de los requerimientos de Met (Met160). En el Cuadro 2 se presenta la composición de ingredientes de las dietas experimentales.

Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales* (%).

Ingrediente	Met100	Met120	Met140	Met160
Trigo	80.08	80.08	80.08	80.08
Pasta de soya, 48%	16	16	16	16
L-Lisina * HCl	0.66	0.66	0.66	0.66
L-Treonina	0.20	0.20	0.20	0.20
DL-Metionina	0.040	0.095	0.150	0.205
L-Valina	0.05	0.05	0.05	0.05
Almidón de maíz	0.165	0.110	0.055	-
Carbonato de calcio	1.25	1.25	1.25	1.25
Ortofosfato	0.80	0.80	0.80	0.80
Sal iodada	0.35	0.35	0.35	0.35
Premezcla de vitaminas y minerales ¹	0.40	0.40	0.40	0.40

*Dietas: Met100, dieta testigo a base de trigo y soya que suministra 100% de Met, cubriendo en 120% de los requerimientos de AA indispensables (NRC, 2012); Met 120, Met 140 y Met 160 contienen 20, 40 y 60 % más de Met que la dieta testigo.

¹Suministrado por kg de dieta: Vitamina A, 4800 UI; vitamina D3, 800 UI; vitamina E, 4.8 UI; vitamina K3, 1.6 mg; riboflavina, 4 mg; D-acido pantoténico, 7.2 mg; niacina, 16 mg; vitamina B12, 12.8 mg; Zn, 64 mg; Fe, 64 mg; Cu, 4 mg; I, 0.36 mg; Se, 0.13 mg.

La composición de aminoácidos en las dietas experimentales fue analizada en la universidad de Missouri y se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Composición analizada de los AA de las dietas experimentales (%).

	Dietas			
	Met 100	Met120	Met140	Met160
Arginina	1.05	1.08	1.07	1.10
Histidina	0.43	0.44	0.43	0.44
Isoleucina	0.71	0.72	0.72	0.73
Leucina	1.25	1.27	1.26	1.28
Lisina	1.30	1.36	1.39	1.48
Metionina	0.32	0.36	0.46	0.54
Fenilalanina	0.85	0.87	0.86	0.87
Treonina	0.84	0.83	0.86	0.90
Triptófano	0.27	0.27	0.27	0.28
Valina	0.88	0.89	0.89	0.91

5.4. Colecta de sangre

El día 18 del experimento se recolectaron muestras de sangre de seis cerdos de cada tratamiento, esta colecta se llevó a cabo a las 1600 h. De cada cerdo se colectaron dos muestras de sangre mediante punción de la vena yugular, utilizando tubos BD Vacutainer de 6.0 ml. Las muestras colectadas se centrifugaron a 1,500 xg a 4°C durante 15 minutos y el suero se transfirió a criotubos de 2.0 ml, para su almacenamiento a -20 °C hasta su posterior análisis.

5.5. Sacrificio y toma de muestras

En la última noche del período experimental se retiraron los comederos de los corrales de todos los cerdos. En la mañana siguiente, de forma aleatoria, se seleccionaron seis cerdos de cada tratamiento (tres cerdos/período), mismos que fueron sacrificados mediante aturdimiento eléctrico y desangrado. Rápidamente las canales fueron evisceradas y se recolectaron muestras de la mucosa intestinal de yeyuno e íleon, mediante raspado con portaobjetos. El tamaño de las muestras fue de 500 mg aproximadamente las cuales se colocaron en microtubos de 2.0 ml

previamente identificados, e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Después de finalizar el muestreo, todas las muestras fueron transportadas al laboratorio de nutrigenómica y almacenadas en un ultracongelador a -80 °C hasta su análisis de expresión génica.

5.6. Análisis en laboratorio

5.6.1. Extracción y purificación total de ARN

La extracción de ARN total de cada muestra de mucosa intestinal se realizó empleando el kit comercial Direct-zol RNA Miniprep (cat. 2050 Zymo Research, CA, EUA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para iniciar, las muestras de raspado de mucosa almacenadas en el ultra congelador fueron pulverizadas con nitrógeno líquido, y a continuación, 50 mg de muestra pulverizada se colocaron en un microtubo frío que contenía 530 µl de Trizol Reagent (Invitrogen, Corp.). La muestra fue homogenizada y centrifugada a 10,000 rpm por 2 min. El sobrenadante fue transferido a un microtubo nuevo de 2ml, se agregó 500 µl de Etanol al 100%, se agitó y transfirió la mezcla a una columna con tubo de colección, posteriormente se centrifugó durante un minuto a 10000 rpm, después se transfirió la columna a un nuevo tubo de colección donde se agregaron 400 µl de buffer de prelavado de ARN y se centrifugó durante un minuto a 10,000 rpm este procedimiento se repitió, Una vez removido el sobrenadante, a la columna con tubo de colección se agregó 700 µl de buffer de lavado de ARN, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min. Después la columna se transfirió a un microtubo de 2ml donde el ARN purificado se eluyó con 30 µL de agua destilada libre de nucleasas, se centrifugó a 10000 rpm durante 2 min, y se almacenó a -82 °C. La integridad del ARN total se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%; en el gel se verificó que la relación de ARNr 28S:18S fuera alrededor de 2:1 (Sambrook y Russell, 2001).

5.6.2. Transcripción reversa

Para cada muestra de ARN, una alícuota de aproximadamente 3 µl de ARN total fue tratada con 1 U de DNasa; (1 U/µl; Thermo Scientific), disuelta en 6 µl de buffer para transcripción reversa (RT 5x) y se agregaron 20.5 µl de agua libre de

nucleasas. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente 5 minutos a 70 °C para detener la reacción. A continuación, se inició la transcripción reversa agregando 1 µl de hexanucleótidos (150 ng/µl, Invitrogen) y 1 µl de solución de DNTPs (10 µM de cada uno, Invitrogen). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego en hielo. Se agregaron 2 µl de buffer de transcripción (RT 5x), 3 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de inhibidor de ribonucleasa (40U/µl; Ribolock, Thermo Scientific). La reacción se incubó a 42 °C durante 2 minutos antes de agregar 1 µl de la enzima transcriptasa reversa (Revert Aid H Minus RT, Thermo Scientific). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a 42 °C durante 50 minutos. Posteriormente, para detener la reacción, la mezcla se incubó a 70 °C durante 15 minutos y luego se enfrió en hielo. Finalmente, las muestras de ADNc se cuantificaron por espectrofotometría (Helios β, Thermo Electron Co.) a 260 nm y se diluyeron a una concentración final de 50 ng/µl.

5.6.3. PCR cuantitativa

Los oligonucleótidos específicos para el ARN mensajero de los transportadores de los aminoácidos: B⁰, b^{0,+}, y+L, se diseñaron con el programa BLAST (NCBI) de acuerdo con sus secuencias publicadas en el Genbank (Cuadro 4). Además, se utilizó el ARN mensajero de la proteína ribosomal 4 (RPL4) de cerdo (GenBank DQ845176.1) como control endógeno para normalizar las variaciones en el ARNm. La expresión de transportadores de AA en yeyuno e íleon, se analizaron mediante ensayos de PCR cuantitativa (qPCR), utilizando SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (Thermo scientific), las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real CFX96 Touch versión 3.0 (BioRad, New England).

Para procesar cada una de las muestras, se preparó una mezcla de reacción, para cada tubo de 0.2 ml se colocó 8 µl de agua libre de nucleasas, 12.5 µl de SYBR Green, 3 µl de Oligo Mix (oligonucleótido específico, 5 µM de cada oligo) y 1.5 µl de ADNc (50 ng/µl).

Las condiciones de amplificación para qPCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos y 40 ciclos (desnaturalización: 95°C por 15 segundos, alineación:

56°C por 15 segundos y extensión: 72°C por 30 segundos). Al terminar cada ciclo, se leyó la fluorescencia de las muestras y se realizó una curva de desnaturalización de 65°C a 95°C.

De cada muestra se amplificaron por duplicado los fragmentos específicos de cada ARNm a analizar, al igual se cuantificó por duplicado la expresión del gen de referencia RPL4. Los resultados de amplificación se analizaron de acuerdo con la metodología $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrita por Livak y Schmittgen (2001), para medir la expresión relativa de los transportadores de AA en yeyuno e íleon.

Cuadro 4. Oligonucleótidos específicos para genes transportadores de AA y gen de referencia RPL4.

ARNm	Secuencia de oligonucleótido	Fragmento amplificado (pb)
B ⁰ (Sus scrofa, B0 neutral amino acid transporter SLC6A19 mRNA, DQ231579.1)	Fw: 5'TCTGTCCACAACAACACTGCGA3' Rv: 5'ACCCGTTGATAAGCGTCAG3'	163
b ^{0,+} (Sus scrofa solute carrier family 7 member 9, mRNA, NM_001110171.1)	Fw: 5'ATCTAGCGCCATCTCCTCGT3' Rv: 5'GGAGCGATTTTCCTTGCAGTC3'	414
y+L (Sus scrofa solute carrier family 7 member 7, mRNA, (NM_001110421.1)	Fw: 5'GTGGGGAACATGATTGGCTC3' Rv: 5'CGATGATGAGGAGGGAGGTC3'	289
RPL4 (Sus scrofa ribosomal protein L4 mRNA DQ845176.1)	Fw: 5'TGAGCTCTATGGCACTTGGC3' Rv: 5'GAATGGTGTTTCGGCGCATT3'	221

5.7. Análisis de aminoácidos en suero

Alícuotas de 1.0 ml de cada muestra de suero fueron liofilizadas en crioviales de 2 ml y enviadas al laboratorio de bioquímica de la Universidad de Missouri. En ese laboratorio se realizó el análisis para la concentración de aminoácidos y metabolitos en suero, en un equipo de HPLC con derivación post-columna de ninhidrina y detector de fluorescencia de acuerdo a lo descrito por Fekkes (1996).

5.8. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SAS, en función del diseño de bloques completos al azar. Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias. Se construyeron contrastes polinomiales para analizar la respuesta lineal o cuadrática de los cerdos en EC al DL-Met suplementado y 3 contrastes no ortogonales: para evaluar el efecto del ambiente (C1: EC100 vs TN100), el efecto de la adición de Met a la dieta (C2: EC100 vs EC120-140-160) y el efecto de la adición de Met a la dieta de cerdos EC vs tratamiento TN (C3: EC120-140-160 vs TN100). Además, se realizó análisis de correlación entre el contenido dietético y sérico de AA. Se consideró un nivel de significancia $P \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Temperatura ambiental, humedad relativa e índice temperatura humedad

La temperatura ambiental (TA) y humedad relativa (HR) registradas cada 15 minutos en las salas en EC y TN durante el periodo experimental se muestran en la Figura 4. Dentro de la sala EC, la TA máxima y mínima fue de 35.6 °C y 27.9 °C respectivamente, con una media de 31.5 °C. La TA mínima ocurrió alrededor de las 0600 h incrementándose a partir de las 0800 h hasta alcanzar la TA más elevada a las 1600 h; durante la noche la TA descendió paulatinamente. La HR más elevada, 77 % se registró entre las 0700 y 0800 h, misma que descendió conforme avanzó el día, hasta alcanzar la mínima de 50 % a las 1800h. En la sala TN, la TA máxima y mínima fue de 25.6 °C y 20.3 °C respectivamente, con una media de 22.8 °C y la HR fluctuó entre 58 % y 80 %.

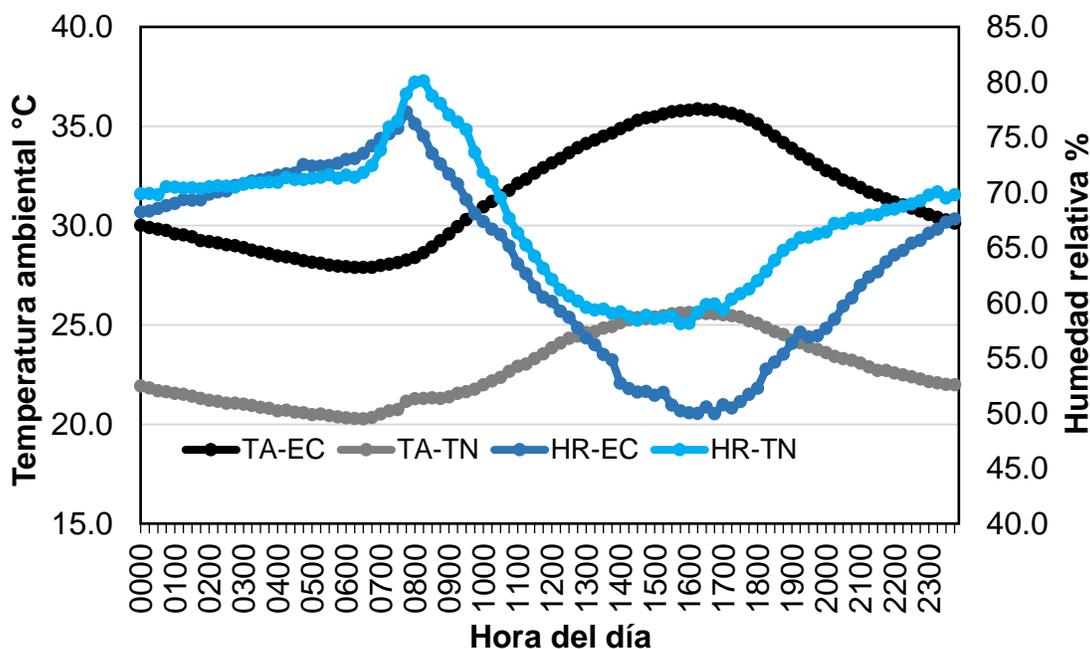


Figura 4. Temperatura ambiental (°C) y humedad relativa (%) en la sala EC y TN.

Los valores relativos obtenidos para el Índice Temperatura Humedad (ITH) en la sala a temperatura ambiente (estrés por calor) se presentan en la Figura 5. El promedio del ITH fue de 78.2 durante el día, con mínimo de 72.3 alrededor de las 0700 h y un máximo de 86 alrededor de las 1600 h del día.

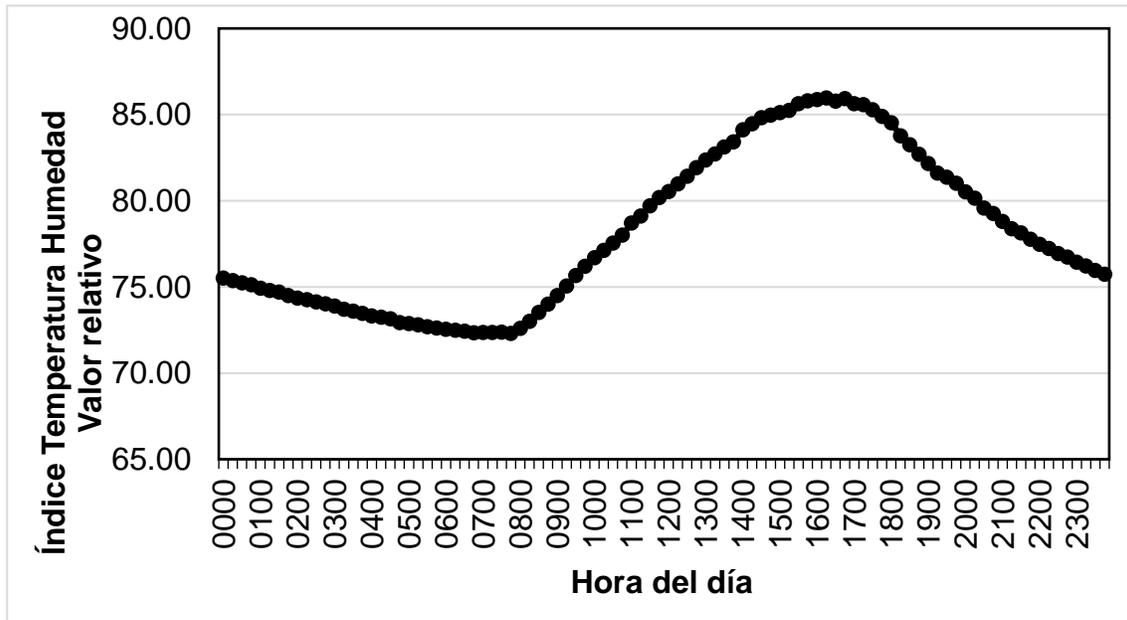


Figura 5. Índice Temperatura Humedad en sala a temperatura ambiente (estrés por calor).

6.2. Constantes fisiológicas: temperatura corporal, temperatura intestinal y frecuencia respiratoria

En la Figura 6 se presentan los valores de temperatura corporal (TC) y temperatura intestinal (TI), registrados cada 5 min en los cerdos en EC. La TC de los cerdos en EC fluctuó de 38.4°C a 39.8 °C, media de 39.4 °C. Alrededor de las 0700 h los cerdos presentaron su TC más baja y a las 2000 h la TC más elevada. Se observó el mismo comportamiento en la TC de los cerdos en TN, cuya TC promedio fue de 39.3°C, con fluctuación de 38.5°C a 39.6°C. Entre las 1200 h a 2000 h ($P < 0.001$) la TC de los cerdos en EC fue mayor ($P < 0.001$) a la de los cerdos en TN. A nivel intestinal la temperatura de los cerdos en EC fue en promedio 40.3°C, con mínima y máxima de 39.8 y 40.8 °C respectivamente.

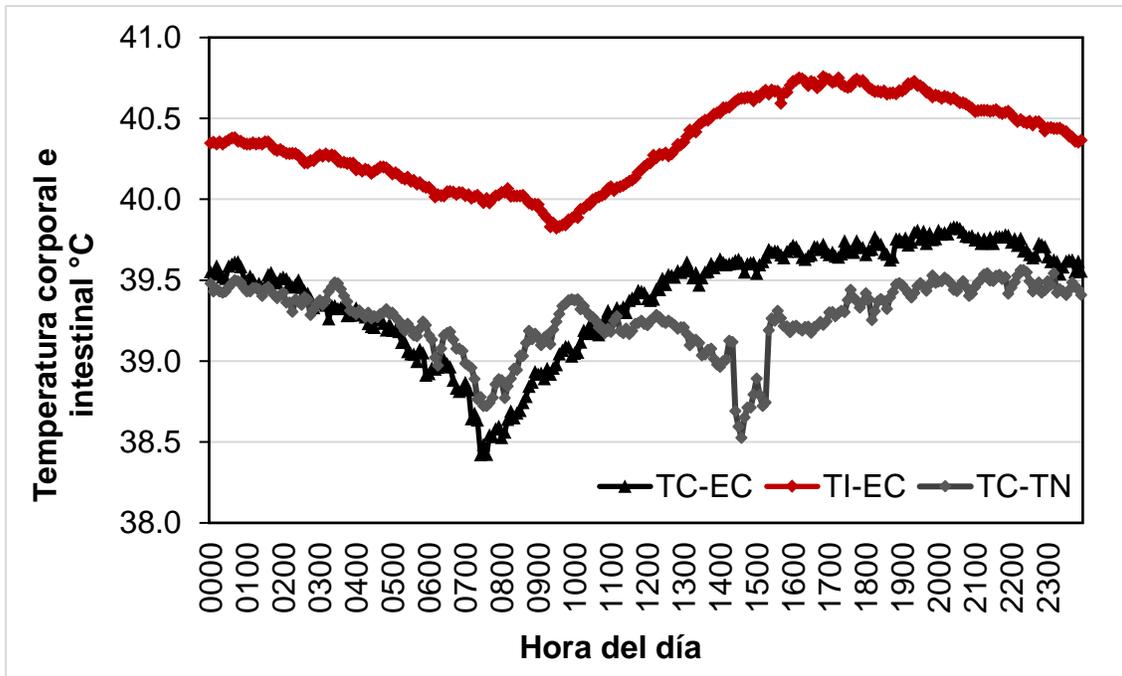


Figura 6. Temperatura corporal (TC), temperatura intestinal (TI) en cerdos en EC y TC en cerdos en condiciones de termoneutralidad (TN).

La frecuencia respiratoria (FR) en los cerdos en EC y TN se muestra en la Figura 7. A las 0700 h de la mañana los cerdos expuestos a EC presentaron una FR promedio de 47 (± 2.6) respiraciones por minuto, mientras que a las 1700 h su FR incrementó ($P < 0.001$) a 94.5 (± 2.6). La FR en los cerdos en TN fue de 38.7 (± 1) y 46 (± 1.2) respiraciones por minuto, a las 0700 h y 1700 h ($P = 0.0002$).

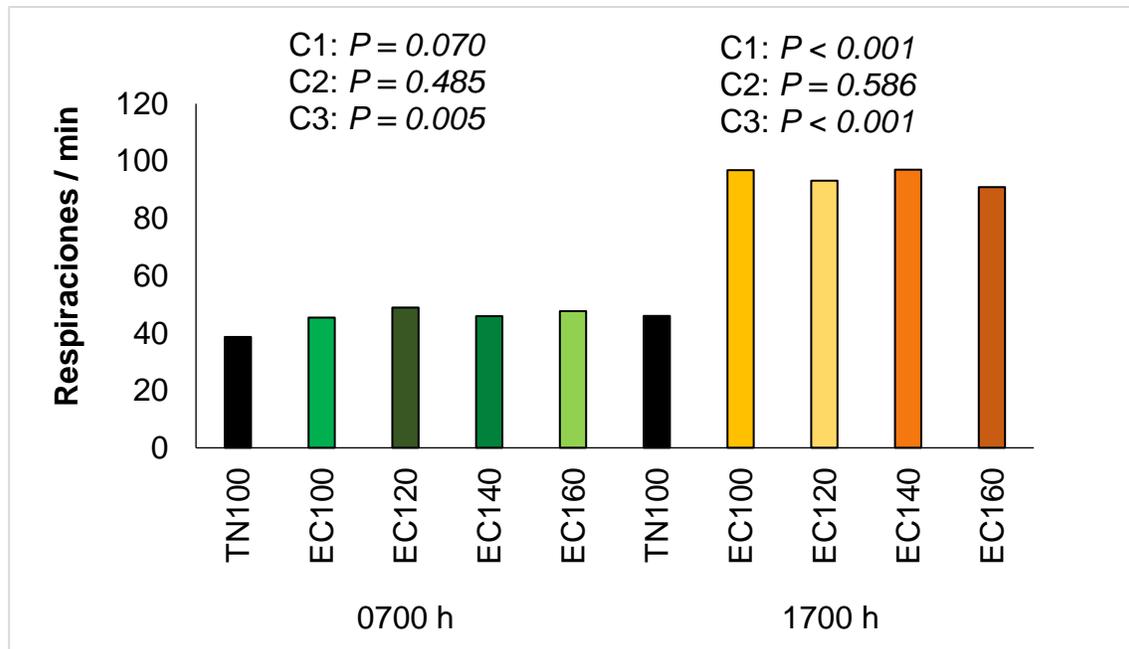


Figura 7. Frecuencia respiratoria en cerdos en estrés por calor y termoneutralidad. Contrastes: C1= EC100 vs TN100, C2= EC100 vs EC120-140-160, C3= EC120-140-160 vs TN100.

6.3. Comportamiento productivo

Los resultados de peso inicial, peso final, consumo diario de alimento, ganancia diaria de peso y relación ganancia de peso: consumo de alimento en cerdos en crecimiento en EC y TN se presentan en el Cuadro 5. De acuerdo con el diseño del experimento, el peso inicial de los cerdos fue similar entre tratamientos; de manera similar no se observó diferencia en el peso final de los cerdos de los distintos tratamientos ($P > 0.05$). El CDA tampoco fue diferente en los cerdos de los distintos tratamientos ($P > 0.05$). La GDP fue mayor ($P = 0.005$) en los cerdos en condiciones de termoneutralidad comparado con aquellos en EC que consumieron una dieta con el 100% del requerimiento de Met. En condiciones de EC, la adición de Met a la dieta (120, 140 y 160 %) provocó un incremento ($P = 0.002$) en la GDP y mejoró ($P = 0.005$) la relación G:C en comparación al tratamiento EC100. No se observaron diferencias ($P > 0.05$) para GDP y relación G:C entre los tratamientos en EC con adición de Met respecto al tratamiento en termoneutralidad. La adición de Met en la dieta de los cerdos en crecimiento incrementó ($P = 0.026$) la GDP de forma lineal.

Cuadro 5. Parámetros de comportamiento productivo de los cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y en estrés por calor alimentados con la dieta testigo (EC100) o con la adición del 120, 140, 160% de metionina (EC120, EC140, EC160).

	Tratamiento						Contrastes Valores de P*				
	TN100	EC100	EC120	EC140	EC160	EE	C1 ¹	C2 ¹	C3 ¹	L ²	Q ²
Peso inicial (kg)	22.93	23.00	23.10	23.03	22.93	0.688	0.997	0.887	0.891	0.905	0.924
Peso Final (kg)	38.23	35.78	38.13	36.32	38.12	1.060	0.109	0.162	0.564	0.316	0.813
Consumo diario alimento (g/d)	1401	1345	1298	1298	1291	0.062	0.526	0.497	0.149	0.601	0.777
Ganancia diaria de peso (g/d)	728	612	720	716	719	0.028	0.005	0.002	0.756	0.026	0.090
Relación G:C	0.523	0.474	0.568	0.563	0.563	0.026	0.202	0.005	0.178	0.056	0.112

*Nivel de significancia de los contrastes $P \leq 0.05$

¹Contrastes: C1= EC100 vs TN100, C2= EC100 vs EC120-140-160, C3= EC120-140-160 vs TN100.

²Contrastes polinomiales: L=respuesta lineal, Q=respuesta cuadrática

6.4. Expresión génica de transportadores de aminoácidos

En la Figura 8 se presenta la expresión relativa al tratamiento TN100 del ARNm de los transportadores B^0 , $b^{0,+}$, y+L en yeyuno e íleon de los cerdos en experimentación; y en la Figura 9 se presenta la expresión de los mismos transportadores relativa al tratamiento EC100. Así también en el Cuadro 6 se presentan los resultados estadísticos del análisis de DCt correspondiente a la expresión relativa de ARNm de los transportadores de aminoácidos en yeyuno e íleon de los cerdos en condiciones termoneutrales o en EC alimentados con dietas adicionadas con metionina.

La expresión relativa del transportador B^0 en yeyuno no fue diferente ($P > 0.05$) entre tratamientos. En condiciones de EC, la adición de Met provocó respuesta cuadrática ($P = 0.013$) en la expresión relativa de $b^{0,+}$ en yeyuno, donde la mayor expresión de este transportador ocurrió con la dieta enriquecida con 40 % extra de Met, mientras que la menor expresión ocurrió con la dieta enriquecida con 60 % extra de Met.

La adición de Met más allá de los requerimientos (20, 40 y 60%) para cerdos en crecimiento, no afectó ($P > 0.05$) la expresión relativa de los transportadores ($b^{0,+}$, y+L) en íleon. La expresión del transportador B^0 en íleon fue menor ($P = 0.009$) en el tratamiento EC100 respecto al tratamiento TN100, la expresión de este transportador también fue menor ($P = 0.013$) en los cerdos en EC alimentados con las dietas enriquecidas con Met en comparación al tratamiento en condiciones de termoneutralidad.

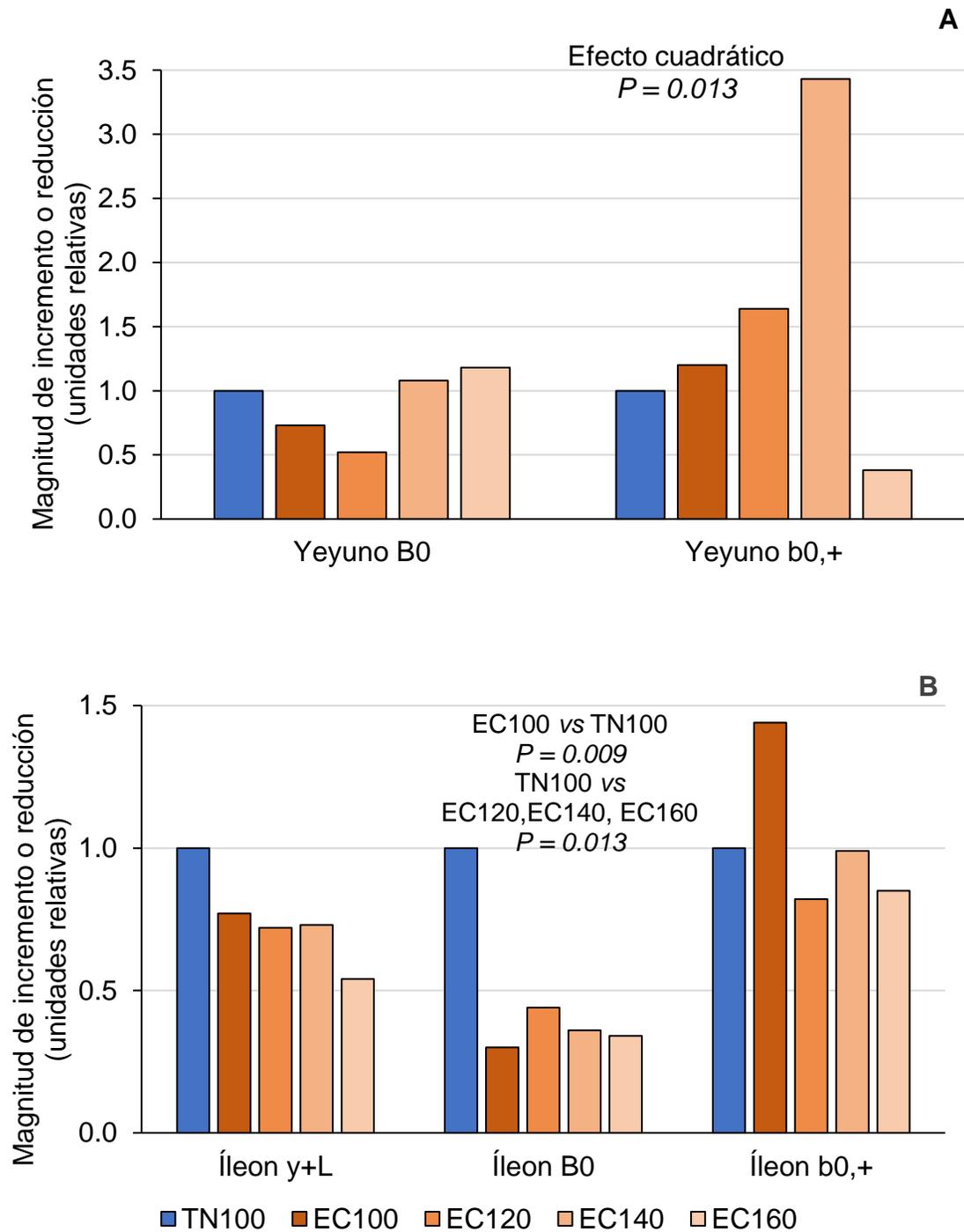


Figura 8. Expresión relativa al tratamiento TN100 de los transportadores de aminoácidos B⁰, b^{0,+}, y+L en yeyuno (A) e íleon (B) de los cerdos en condiciones termoneutrales o en EC alimentados con dietas enriquecidas con metionina.

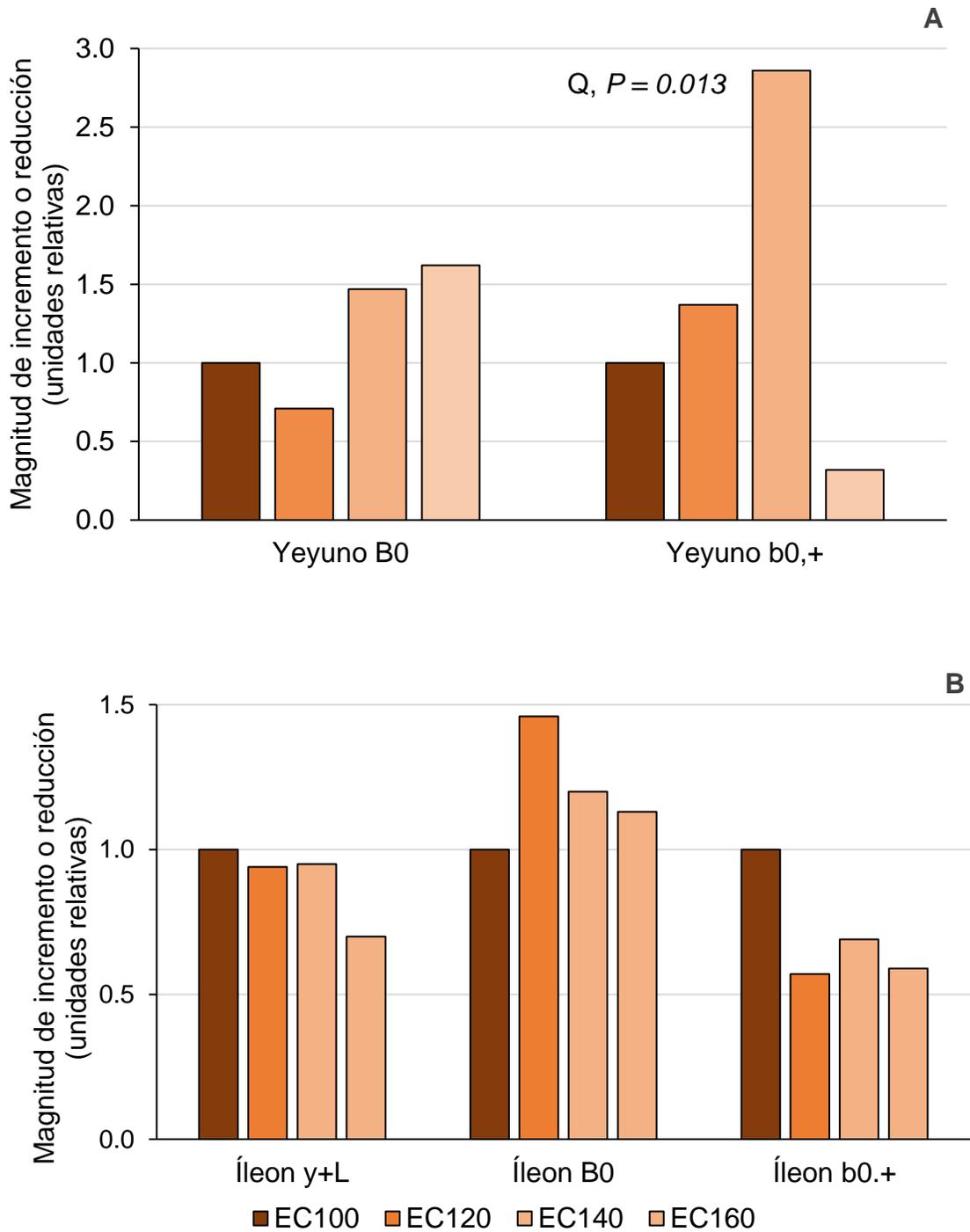


Figura 9. Expresión relativa al tratamiento EC100 de los transportadores de aminoácidos B⁰, b^{0,+}, y+L en yeyuno (A) e íleon (B) de los cerdos en condiciones termoneutrales o en EC alimentados con dietas enriquecidas con metionina.

Cuadro 6. Análisis del Dct de la expresión del ARNm de los transportadores de aminoácidos B⁰, b^{0,+}, y+L en intestino delgado de cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y en estrés por calor alimentados con la dieta testigo (EC100) o con la adición del 120, 140, 160% de metionina (EC120, EC140, EC160).

Transportador de AA	Segmento intestinal	Tratamiento					EE	Contrastes				
		TN	EC	EC	EC	EC		Valores de P*				
		100	100	120	140	160		C1 ¹	C2 ¹	C3 ¹	L ²	Q ²
B ⁰	Yeyuno	2.62	2.56	3.57	2.52	2.38	0.43	0.918	0.599	0.688	0.443	0.215
	Íleon	2.57	3.97	3.42	3.70	3.80	0.34	0.009	0.413	0.013	0.883	0.372
b ^{0,+}	Yeyuno	5.42	5.16	4.71	3.65	6.80	0.56	0.756	0.883	0.544	0.194	0.013
	Íleon	4.85	4.33	5.14	4.86	5.08	0.39	0.359	0.123	0.707	0.251	0.447
y+L	Íleon	2.53	2.92	3.01	2.99	3.43	0.43	0.556	0.660	0.245	0.473	0.707

*Nivel de significancia de los contrastes P≤0.05

¹Contrastes: C1= EC100 vs TN100, C2= EC100 vs EC120-140-160, C3= EC120-140-160 vs TN100.

²Contrastes polinomiales: L=respuesta lineal, Q=respuesta cuadrática

6.5. Consumo y concentración de aminoácidos en suero

El consumo diario (g/d) de AA esenciales en los cerdos, se calculó con base a la composición de AA de la dieta correspondiente y el consumo diario de alimento por cerdo, los resultados se presentan en el Cuadro 7. De acuerdo con el diseño del experimento, con excepción de Met, el consumo de todos los aminoácidos esenciales fue similar entre tratamientos ($P > 0.05$). La adición de Met en las dietas se reflejó en el mayor consumo ($P < 0.001$) de este AA en los cerdos en EC que recibieron las dietas adicionadas con 120, 140 y 160% de Met, en comparación con los que recibieron la dieta testigo (TN100 y EC100). Tal como se esperaba, se observó una respuesta lineal ($P < 0.001$) para el consumo de Met al incrementar el nivel de suplementación de este aminoácido. No se presentó respuesta lineal o cuadrática para el consumo del resto de AA esenciales.

Cuadro 7. Consumo diario (g/d) de AA esenciales en cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y en estrés por calor alimentados con la dieta testigo (EC100) o con la adición del 120, 140, 160% de metionina (EC120, EC140, EC160).

AA	Tratamiento					EE	Contrastes Valores de P*				
	TN	EC	EC	EC	EC		C1 ¹	C2 ¹	C3 ¹	L ²	Q ²
Arg	14.78	14.17	14.03	13.88	14.21	0.70	0.543	0.869	0.364	0.990	0.754
His	6.03	5.78	5.70	5.62	5.72	0.28	0.541	0.754	0.290	0.842	0.771
Iso	9.93	9.52	9.36	9.34	9.42	0.47	0.542	0.785	0.309	0.889	0.806
Leu	17.46	16.74	16.51	16.38	16.55	0.83	0.542	0.784	0.309	0.859	0.825
Lis	18.22	17.47	17.61	18.03	19.14	0.90	0.558	0.447	0.965	0.216	0.620
Met	4.45	4.26	4.71	5.92	6.95	0.27	0.637	<0.0001	<0.0001	<0.001	0.333
Fen	11.89	11.40	11.25	11.10	11.26	0.56	0.542	0.759	0.294	0.826	0.803
Tre	11.81	11.32	10.73	11.17	11.58	0.56	0.541	0.801	0.318	0.658	0.409
Trp	3.82	3.66	3.53	3.52	3.58	0.18	0.532	0.575	0.188	0.769	0.628
Val	12.30	11.79	11.53	11.53	11.78	0.58	0.541	0.789	0.311	0.993	0.678

*Nivel de significancia de los contrastes $P \leq 0.05$

¹Contrastes: C1= EC100 vs TN100, C2= EC100 vs EC120-140-160, C3= EC120-140-160 vs TN100.

²Contrastes polinomiales: L=respuesta lineal, Q=respuesta cuadrática.

En el Cuadro 8 se presentan las concentraciones de AA esenciales en el suero de los cerdos. Las concentraciones séricas de Iso, Leu, Lis, Fen y Val fueron mayores ($P < 0.05$) en el tratamiento EC100 respecto al tratamiento TN100. En condiciones de EC la adición de 120, 140 y 160% de Met en la dieta provocó una reducción ($P < 0.05$) en las concentraciones séricas de His, Iso, Leu, Lis, Fen, Tre y Val en comparación al tratamiento sin adición extra de metionina. En comparación con el tratamiento en termoneutralidad, la CS de Lys en los cerdos en EC, disminuyó ($P = 0.012$) al incrementar la adición de metionina a las dietas en 120, 140 y 160%. Las concentraciones de Arg y Trp en suero no fueron significativamente diferentes entre tratamientos ($P > 0.05$). Tal como se esperaba, se observó un incremento ($P < 0.01$) lineal en la concentración sérica de Met al adicionar 120, 140 y 160% de Met a las dietas de los cerdos en EC. También se observó disminución lineal ($P < 0.05$) en las concentraciones séricas de Iso, Leu y Val, y una respuesta cuadrática ($P < 0.05$) en las concentraciones séricas de Arg, Leu, Lis y Fen en condiciones de EC.

Cuadro 8. Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de AA esenciales en suero de cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y en estrés por calor alimentados con la dieta testigo (EC100) o con la adición del 120, 140 y 160% de metionina (E120, EC140, EC160).

AA	Tratamiento					EE	Contrastes			L ²	Q ²
	TN100	EC100	EC120	EC140	EC160		Valores de P*				
							C1 ¹	C2 ¹	C3 ¹		
Arg	37.10	36.69	34.54	24.79	38.32	2.59	0.912	0.178	0.140	0.677	0.006
His	14.27	15.10	12.36	12.81	11.87	1.08	0.589	0.037	0.138	0.081	0.432
Iso	20.63	25.42	23.42	20.98	21.98	1.24	0.011	0.029	0.304	0.023	0.210
Leu	25.83	34.66	27.18	25.64	28.27	1.88	0.003	0.002	0.584	0.021	0.013
Lis	48.75	58.32	34.07	31.44	50.04	3.25	0.048	<0.001	0.012	0.082	<0.001
Met	5.47	5.84	7.11	7.50	12.90	0.40	0.525	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Fen	15.92	19.93	15.78	15.32	18.04	1.04	0.012	0.007	0.706	0.224	0.042
Tre	39.32	43.94	36.20	32.31	36.20	3.30	0.331	0.026	0.258	0.062	0.072
Trp	10.53	10.48	10.29	9.40	10.35	0.65	0.960	0.535	0.496	0.656	0.381
Val	46.03	57.02	47.36	44.31	45.92	2.94	0.014	0.003	0.962	0.008	0.056

*Nivel de significancia de los contrastes $P \leq 0.05$

¹Contrastes: C1= EC100 vs TN100, C2= EC100 vs EC120-140-160, C3= EC120-140-160 vs TN100.

²Contrastes polinomiales: L=respuesta lineal, Q=respuesta cuadrática.

En el Cuadro 9 se presentan las concentraciones de aminoácidos no esenciales en suero de cerdos en crecimiento empleados en este experimento. Las concentraciones séricas de Gln y Gli fueron mayores ($P < 0.05$) en el tratamiento EC100 respecto al tratamiento TN100. La adición de 120, 140 y 160 % de metionina en la dieta de los cerdos en EC provocó una reducción ($P = 0.044$) en la CS de Ser en comparación con el tratamiento EC100. La CS de Gln fue mayor ($P = 0.08$) al incrementar el nivel de adición de Met a las dietas en EC en comparación con el tratamiento en termoneutralidad. No se observó respuesta lineal o cuadrática en la concentración sérica de AA no esenciales por la adición extra de metionina en la dieta de cerdos en EC.

Para demostrar si el consumo diario de aminoácidos provoca un incremento o disminución en su concentración sérica, se realizó un análisis de correlación. Los coeficientes de correlación entre el consumo diario y la concentración sérica de AA esenciales en cerdos en condiciones de termoneutralidad y estrés por calor se presentan en el Cuadro 10. Se observó una correlación positiva ($r > 0.92$; $P < 0.026$) entre el consumo y la concentración de Met. En condiciones de estrés por calor, se observó una correlación positiva ($r > 0.95$; $P < 0.05$) entre el consumo y la concentración sérica de Arg y Leu.

Cuadro 9. Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de AA no esenciales en suero de cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y estrés por calor alimentados con la dieta testigo (TN100) o con la adición del 120, 140 y 160% de metionina (EC120, EC140, EC160).

AA	Tratamiento						Contrastes				
	TN100	EC100	EC120	EC140	EC160	EE	Valores de P*				
							C1 ¹	C2 ¹	C3 ¹	L ²	Q ²
Ala	72.40	90.18	93.19	82.88	81.83	7.69	0.115	0.640	0.139	0.335	0.803
Asp	3.44	4.10	4.90	3.68	3.72	0.46	0.321	0.991	0.223	0.307	0.455
Asn	9.49	10.02	9.72	8.74	8.83	0.74	0.620	0.293	0.650	0.168	0.785
Glu	19.19	24.93	34.01	20.29	23.76	3.87	0.305	0.810	0.139	0.375	0.517
Gln	44.68	68.29	72.36	58.02	59.31	5.55	0.006	0.437	0.008	0.132	0.815
Gli	56.12	76.90	66.52	62.76	63.76	5.56	0.014	0.062	0.212	0.105	0.329
Pro	67.91	80.92	82.75	73.87	67.62	6.07	0.142	0.387	0.339	0.098	0.528
Ser	32.95	37.83	29.05	32.58	27.32	3.34	0.311	0.044	0.401	0.078	0.607
Tir	25.03	24.40	25.49	23.47	23.19	2.31	0.850	0.897	0.718	0.599	0.774

*Nivel de significancia de los contrastes $P \leq 0.05$

¹Contrastes: C1= EC100 vs TN100, C2= EC100 vs EC120-140-160, C3= EC120-140-160 vs TN100.

²Contrastes polinomiales: L=respuesta lineal, Q=respuesta cuadrática.

Cuadro 10. Coeficientes de correlación de Pearson entre el consumo diario y la concentración sérica de aminoácidos esenciales.

	Cerdos en TN y EC		Cerdos en EC	
	r	P*	r	P*
Arg	0.616	0.268	0.957	0.043
His	0.576	0.309	0.592	0.408
Ile	-0.301	0.623	0.803	0.198
Leu	-0.086	0.891	0.975	0.025
Lys	0.117	0.852	0.098	0.902
Met	0.922	0.026	0.906	0.094
Phe	0.006	0.993	0.881	0.119
Thr	0.302	0.622	0.211	0.789
Trp	0.625	0.259	0.679	0.321
Val	0.029	0.964	0.588	0.412

*Nivel de significancia $P \leq 0.05$

6.6. Concentración de metabolitos en suero

Las concentraciones de metabolitos en suero de cerdos en crecimiento en condiciones de termoneutralidad y en estrés por calor alimentados con las dietas con adición de metionina se presentan en el Cuadro 11. Las concentraciones séricas de β -Alanina, citrulina, cistationina/alcistationina, etanolamina, 1-Metil-Histidina, 3-Metil-Histidina, hidroxilisina, hidroxiprolina, ornitina, sarcosina, taurina, urea y ácido α amino adípico, no fueron diferentes ($P > 0.05$) entre tratamientos. La CS de carnosina fue menor ($P = 0.024$), mientras que la CS de homocisteína fue mayor ($P = 0.001$) en cerdos en condiciones de estrés por calor (EC100) comparado con aquellos en condiciones de termoneutralidad (TN100). La adición del 120, 140 y 160 % de Met en la dieta de los cerdos en EC provocó una reducción en la CS de homocisteína ($P = 0.007$) e incrementó ($P < 0.05$) la CS de fosfoserina y del ácido α -amino-butírico en comparación con el tratamiento EC100. Las concentraciones séricas de carnosina y homocisteína disminuyeron ($P > 0.05$) y las concentraciones séricas de fosfoserina y del ácido α -amino-butírico incrementaron ($P > 0.05$) con las dietas enriquecidas con metionina respecto al tratamiento en termoneutralidad.

Cuadro 11. Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de metabolitos en suero de cerdos en condiciones de termoneutralidad alimentados con la dieta testigo (TN100) y en estrés por calor, alimentados con la dieta testigo (EC100) o con la adición del 120, 140 y 160% de metionina (EC120, EC140, EC160).

Metabolito	Tratamiento					EE	Contrastes: Valores de P*		
	TN100	EC100	EC120	EC140	EC160		C1 ¹	C2 ¹	C3 ¹
β -Alanina	0.70	0.70	0.82	0.38	0.68	0.15	0.975	0.664	0.692
Carnosina	5.68	3.83	5.16	4.03	3.76	0.54	0.024	0.446	0.040
Citrulina	8.39	6.83	8.28	7.46	6.99	0.93	0.248	0.493	0.458
Cistationina/Alocistationina	0.37	0.56	0.45	0.68	0.57	0.15	0.384	0.959	0.266
Etanolamina	2.73	2.26	1.94	1.86	3.11	0.40	0.409	0.918	0.364
Homocisteína	0.00	2.92	1.08	1.65	0.77	0.52	0.001	0.007	0.062
1-Metil-Histidina	1.42	3.87	2.67	2.69	2.51	0.95	0.079	0.265	0.279
3-Metil-Histidina	0.81	1.08	0.99	0.88	0.90	0.11	0.085	0.216	0.363
Hidroxilisina	0.90	0.80	1.04	0.68	0.94	0.20	0.749	0.732	0.961
Hidroxiprolina	7.74	10.66	11.89	10.46	11.14	1.21	0.100	0.720	0.021
Ornitina	19.82	17.26	17.81	15.45	15.94	2.17	0.413	0.735	0.185
Fosfoserina	1.44	1.46	1.77	1.63	1.65	0.09	0.849	0.049	0.030
Sarcosina	1.51	5.91	4.86	4.54	3.42	2.01	0.134	0.487	0.245
Taurina	14.65	12.94	14.46	14.19	15.27	1.44	0.407	0.316	0.992
Urea	261.69	252.07	261.80	265.89	213.66	20.26	0.740	0.834	0.539
Ácido α -amino-adípico	6.29	8.28	5.93	5.80	4.84	1.23	0.265	0.064	0.593
Ácido α -amino-butírico	1.63	1.31	2.23	2.30	2.97	0.34	0.511	0.006	0.038

*Nivel de significancia de los contrastes $P \leq 0.05$

¹Contrastes: C1= EC100 vs TN100, C2= EC100 vs EC120-140-160, C3= EC120-140-160 vs T100

7. DISCUSIÓN

El rango óptimo de temperatura ambiental para la producción de cerdos en crecimiento es de 18 a 21°C (Huynh et al., 2005). En consecuencia cerdos expuestos a TA de 33 °C o superior y HR igual o mayor de 43%, manifiestan signos de estrés por calor (Cervantes et al., 2018; Pearce et al., 2012). Durante el periodo experimental los cerdos estuvieron expuestos a TA superior a los 33°C y HR superior al 50% durante 8 horas al día (1200 h a 2000 h). Además de acuerdo con Hahn et al. (2009), entre las 0900 h y las 0200 h del siguiente día el ITH a que estuvieron sometidos los cerdos fue de alerta, peligro y emergencia.

A consecuencia de la TA elevada, se ha observado que los cerdos presentan dificultades para mantener su TC, por lo que en estas condiciones su TC y TI se presentan elevadas (Cervantes et al., 2016). Durante las horas más cálidas del día, la TC de los cerdos en EC de este experimento fue de 0.46°C superior a la observada en los cerdos en condiciones de TN. También se observó que durante todo el periodo la TI fue de 1°C superior a la TC, ya que esta última se registró de la región subcutánea, a diferencia de la primera que se tomó directamente en el interior del intestino. Específicamente en los cerdos en EC la TC siguió un patrón similar a la temperatura ambiente manifestando la máxima TI y TC durante las horas más cálidas del día, lo que evidencia la dificultad de los cerdos para liberar calor corporal. Anteriormente se habían reportado incrementos de 1.3°C en la TI (Morales et al., 2018) e incrementos de la TC en 0.8 °C o superior durante las horas más cálidas del día (Morales et al., 2016a. Morales et al., 2016b). Ese incremento en la TC puede explicarse parcialmente por la redistribución del flujo sanguíneo, efecto que incrementa el volumen de sangre en los vasos sanguíneos periféricos para la disipación de calor hacia el ambiente (Wilson y Crandall, 2011; Wolp et al., 2012; Cottrell et al., 2015).

Ante la necesidad de liberar calor los cerdos en EC incrementan su FR para perder calor por evaporación (Patience et al., 2005). Por ello, se considera un indicador de EC al incremento de la FR, una vez que esta se incrementa a medida que la TA se

eleva por encima de la zona de confort de los animales. De acuerdo con Vandelannoote et al. (2012), es indicativo de EC cuando los cerdos tienen una FR superior a 50 respiraciones por minuto. En este estudio los cerdos mantenidos en condiciones de EC duplicaron su FR durante la tarde (94.5 respiraciones por minuto), cuando la TA fue más elevada, en comparación con los mantenidos en confort térmico. Los resultados de este estudio coinciden con los de otros autores quienes demostraron que durante la exposición al calor los cerdos incrementan su FR a 97-130 respiraciones por minuto (Patience et al., 2005; Manno et al., 2006; Oliveira et al., 2019).

Es posible inferir que, de acuerdo a lo observado en las condiciones ambientales y al incremento de sus constantes fisiológicas, los cerdos en los tratamientos EC de este estudio estuvieron efectivamente expuestos a estrés por calor.

Numerosos trabajos han demostrado que los cerdos expuestos a temperatura ambiental elevada y constante, reducen el consumo de alimento (Santos et al., 2018; da Fonseca et al., 2019) y que esta reducción puede alcanzar el 40% o más dependiendo del tiempo y el grado de exposición a calor (Collin et al., 2001; Renaudeau et al., 2008; Pearce et al., 2012). En el presente experimento no se observó una reducción significativa en el consumo de alimento en los cerdos en EC. En general la digestión y el metabolismo de la proteína incrementan la temperatura corporal (Morales et al., 2020), por lo que los cerdos en EC reducen su consumo de alimento en el intento de disminuir la producción de calor y así reducir el gasto metabólico de disipar el calor del cuerpo (Patience et al., 2015). Es probable que el no observar diferencia en el nivel de consumo de los cerdos de este estudio se debe a que fueron alimentados con dietas que contenían aminoácidos libres (Met, Lis, Tre, Val) los cuales pudieron absorberse rápidamente, sin necesidad de producir calor en su digestión (Kerr et al., 2003), además en este estudio se observó que la adición de Met (120, 140, y 160 %) provocó un incremento lineal en su concentración sérica y disminuyó la concentración de los AA esenciales (Lis, Leu, Val, Iso, Tre, His y Fen), indicando su absorción, disponibilidad y uso para el crecimiento de los animales (Blachier et al., 2013; Thomson and Friendship, 2019).

El EC en cerdos provoca una reducción en la ganancia diaria de peso y afecta la eficiencia de utilización de los nutrientes (Morales et al., 2014, Renaudeau et al., 2006). En este estudio la GDP de los animales se recuperó un 15% con la adición de Met a las dietas, además la relación ganancia: consumo también mejoró y, por lo tanto, el comportamiento productivo en los cerdos fue similar entre el tratamiento TN y los tratamientos EC120, EC140 y EC160. Se ha observado que en condiciones termoneutrales, la suplementación con Met en la dieta incrementa la GDP y mejora la conversión alimenticia en pollos de engorda (Wang et al., 2019) y en lechones post destete (Chen et al., 2014). Sin embargo la exposición crónica al calor altera el requerimiento individual de AA (especialmente azufrados y de cadena ramificada) en tejidos específicos, provoca degradación de la proteína corporal y reduce la digestión de proteínas (Belhadj Slimen et al., 2016; Ríus, 2019). De acuerdo con Morales et al. (2018 y 2019) cubrir los requerimientos de AA siguiendo la recomendación del NRC no es suficiente para satisfacer las necesidades de mantenimiento y producción de los cerdos en EC, por lo que una opción viable es enriquecer las dietas con AA libres. Lis es el primer aminoácido limitante, Tre es el segundo aminoácido limitante (Fan et al., 2013) y Val es el quinto (González, 2021), frecuentemente estos AA son deficientes en las dietas para cerdos (NRC, 2012). En coincidencia con los trabajos de Morales et al. (2018 y 2019), las dietas EC120, EC140 y EC160 además de Met contenían un 20% extra de Lis, Tre y Val lo que pudo haber contribuido a que no se observaron diferencias marcadas en la eficiencia productiva de estos cerdos en EC en comparación con TN.

La disponibilidad de aminoácidos consumidos en la dieta está relacionada con la actividad de las proteínas responsables de transportar los aminoácidos a través de las membranas celulares. La expresión de genes que codifican transportadores para Met es compleja y puede depender del equilibrio y la disponibilidad de otros aminoácidos (Zhang et al., 2017). En este experimento además de Met las dietas contenían 20 % extra de Lis, Tre y Val. B⁰ es el principal transportador de Met y otros AA neutros (Hyde et al., 2003; S. Zhang et al., 2017), b^{0,+} es otro transportador importante para la absorción de Met, otros AA neutros y AA catiónicos (Arg, Lis), que intercambia la salida de un aminoácido neutro por la entrada de un aminoácido

catiónico, ambos transportadores están ubicados en la membrana apical del enterocito, mientras que y⁺L se ubica en la membrana basolateral y puede transportar Met, otros AA neutros y AA catiónicos (Bröer, 2008; Mastrototaro et al., 2016), por lo tanto estos transportadores son los principales involucrados para la absorción de Met y del resto de AA esenciales en los enterocitos.

Yeyuno es el segmento principal del intestino donde ocurre la absorción de aminoácidos, seguido de íleon y duodeno (Wu, 2013). En el presente estudio, la expresión relativa del transportador B⁰ en yeyuno fue similar en todos los tratamientos, sin embargo, en íleon la expresión de B⁰ disminuyó en los tratamientos en EC en comparación con el tratamiento en TN, en coincidencia con Morales et al. (2020), la expresión de B⁰ en íleon fue menor al suplementar todos los AA en forma libre en los cerdos en condiciones de EC. La menor expresión de B⁰ en íleon podría relacionarse con la menor altura de vellosidades intestinales en EC100 (Pérez., datos no publicados), sin embargo, con la adición de Met se observó la misma respuesta, probablemente la mayor expresión de este transportador ocurre en duodeno en comparación al resto de segmentos intestinales. De manera similar, la suplementación de Arg a cerdos en EC incrementó la expresión de B⁰ en duodeno y se mantuvo sin cambios en yeyuno e íleon (González, 2020). La suplementación de DL-Met en aves en condiciones de termoneutralidad provocó una mayor expresión de B⁰ en duodeno y yeyuno (Zhang et al., 2017). Probablemente la disponibilidad de AA en forma libre en la luz intestinal estimulan la expresión del transportador, facilitando su rápida absorción en duodeno (Morales et al., 2015).

El incremento en la expresión de b^{0,+} en yeyuno posiblemente ocurrió porque el consumo de Met en EC fue mayor al adicionar este aminoácido a las dietas, cuando Met se acumula en el enterocito su salida puede ser a través de este transportador (Mastrototaro et al., 2016). En condiciones de termoneutralidad se ha observado que la adición de Lis, Tre y Met en la dieta incrementa la expresión de b^{0,+} en yeyuno (García et al., 2012). Met y otros AA neutros estimulan la absorción de AA catiónicos (Mastrototaro et al., 2016), b^{0,+} transporta Lys en yeyuno con mayor afinidad al no depender de Na (Trottier y Manjarín, 2012) y de esta forma se produce el

intercambio de AA. En algunos estudios se ha reportado que el EC disminuye la expresión del transportador $b^{0,+}$ en yeyuno, cuando los cerdos se exponen a una TA máxima de 43-45°C durante las horas más cálidas del día (Morales et al., 2014), sin embargo el EC no afecta la expresión del transportador $b^{0,+}$ en duodeno y yeyuno, cuando los animales se exponen a TA de 34-37°C; probablemente la expresión depende de la intensidad y el tiempo de exposición al calor (Cervantes et al., 2016). En este estudio la TA máxima (35.6 °C) no afectó negativamente la expresión de $b^{0,+}$ en yeyuno, además la expresión en íleon fue similar en todos los tratamientos.

La expresión relativa del transportador y+L en íleon fue similar en todos los tratamientos de este estudio. González (2020) no observó diferencias significativas en la expresión de y+L en íleon, al suplementar Arg a cerdos en condiciones de EC. El transportador y+L intercambia (Arg, Lis e His) por AA de cadena larga: Leu, Met (Mastrototaro et al., 2016). Sin embargo, la adición de Lis y el incremento de Met en las dietas no provocó mayor expresión de este transportador, en condiciones de EC. La afinidad y la capacidad de los sistemas de transporte varía en los diferentes segmentos del intestino; los transportadores en yeyuno pueden tener mayor afinidad, pero menor capacidad para el transporte de Lis, mientras que los transportadores en íleon tienen menor afinidad pero mayor capacidad de transporte de Lis (Chiba, 2013).

La concentración de AA en suero es un indicador de su disponibilidad para el crecimiento de los animales (Tabiri et al., 2000; Cervantes et al., 2017; Kim et al., 2020). Esta concentración depende de su contenido y consumo en la dieta, las tasas de su síntesis y utilización, y de la síntesis de proteínas intracelulares (Wu, 2013). La CS de AA esenciales (Lis, Leu, Iso, Val, Tre, His y Fen) y Ser fue mayor mientras que la CS de Met fue menor en los cerdos del tratamiento EC100, esta dieta cubría el 100% del requerimiento de Met de acuerdo con el NRC. Es probable que en EC Met se haya convertido en un AA limitante, y que en consecuencia varios de los AA esenciales hayan sido subutilizados por los cerdos y por ello se hubieran encontrado circulando en sangre. Además se puede inferir que la mayor afinidad de B^0 para el transporte de Leu y Val (Mastrototaro et al., 2016) probablemente provocó una

competencia por el transporte de Met en los enterocitos reduciendo la absorción de Met. En algunos estudios en EC se ha observado reducción en la CS de Lis y Met, así como incremento en la CS de AA de cadena ramificada (Val, Iso, Leu) y Fen (Morales et al., 2014), en EC también incrementan las CS de Asp, Glu, y Fen (Belhadj Slimen et al., 2016). Un aumento en las concentraciones plasmáticas de algunos AA (Leu y Gli) puede indicar un consumo inadecuado de la proteína dietética que da como resultado una mayor degradación de las proteínas intracelulares (Wu, 2013).

Para explicar la limitancia de Met, se ha reportado que, a nivel fisiológico, los cerdos en EC se encuentran en un estado de estrés oxidativo (Ross et al., 2015; Pearce et al., 2012), en el que se incrementa la degradación de proteínas dañadas a nivel celular, derivadas de un aumento de proteólisis y autofagia (Montilla et al., 2014). Met además de ser un bloque en construcción de proteínas tiene funciones antioxidantes importantes: asociado a la enzima metionina sulfóxido reductasa A o como precursor de Cis para la síntesis de glutatión (Wu, 2013; Martínez et al., 2017), por lo que su requerimiento en animales en EC pudiera estar incrementado, y su deficiencia asociarse a una reducción en el crecimiento del animal.

Así también, se ha documentado que la deficiencia de AA azufrados (Met y Cis) afecta negativamente el crecimiento de la mucosa intestinal, reduce la proliferación de células intestinales en cerdos (Bauchart-Thevret et al., 2009). Por lo que también se observó que cerdos en EC de este mismo estudio presentaron una reducción en la altura de vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon (Pérez., datos no publicados). Cuando el consumo de Cis es bajo, un gran porcentaje de Met disponible es metabolizada vía transulfuración para la formación de Cis incrementando el requerimiento de Met (Kohlmeier, 2015).

Una vez que Met se suplementó (niveles de Met de 120, 140 y 160%) se observó una mayor CS de Met y reducción en la concentración sérica del resto de los AA esenciales, lo que indicaría que Met dejó de ser limitante y estos otros AA fueron utilizados para el crecimiento y otras funciones en los animales. Morales et al. (2019) reportaron una mayor CS de AA esenciales en cerdos en EC, cuando estos

se añadieron en forma libre a la dieta, esta respuesta ocurrió porque los AA con excepción de Arg se agregaron en 25 % más en la dieta. El consumo y la forma en que se agregan los AA en la dieta influyen en la concentración sérica, porque los AA en forma libre se absorben rápidamente (Morales et al., 2016c; Yang y Liao, 2019). En este experimento la correlación positiva entre el consumo y la CS de AA (Arg y Leu) indica que, si estos AA se hubiesen agregado en mayor cantidad a las dietas, el consumo y la CS posiblemente se habrían incrementado como ocurrió con Met. Sin embargo, la adición de Met, Lis, Tre y Val permitió la homeostasis celular en los cerdos en EC, sin necesidad de incluir todos los AA esenciales en la dieta.

Met es de los AA más susceptibles a la oxidación, convirtiéndose en sulfóxido de metionina, por su capacidad de atrapar radicales libres puede proteger a las proteínas del daño oxidativo (Fan et al., 2013; Yang y Liao, 2019). Met es convertido a Cis a través de homocisteína o bien homocisteína puede utilizarse para sintetizar nuevamente Met (Kohlmeier, 2015), la CS de homocisteína fue menor en los cerdos de los tratamientos en EC (dietas enriquecidas con Met) respecto al tratamiento EC100, probablemente estos valores explican la transformación de este metabolito a Cis. Además, Cis permite la síntesis de glutatión que es un tripéptido antioxidante (Le Floc'h et al., 2018), en los animales de este mismo experimento se observó que la actividad de glutatión (GSH) tendió a ser mayor en los cerdos alimentados con las dietas con adición de Met (Pérez., datos no publicados).

Con las dietas enriquecidas con Met, la absorción de Lis por los transportadores $b^{0,+}$ y $y+L$ permitió su disponibilidad para la formación de proteína muscular, $b^{0,+}$ es un transportador con alta afinidad por Lis y Arg a cambio de la salida de Leu (Bröer, 2008; Trottier y Manjarín, 2012). Lis al suplementarse en la dieta posiblemente se absorbió rápidamente y no compitió con Arg para su transporte ya que la CS de Arg no disminuyó significativamente como en el caso de Lis. También se observó que la CS de Leu disminuyó lo que podría indicar un balance en la CS de los AA de cadena ramificada, ya que el exceso de Leu incrementa el catabolismo de Iso y Val (D'Mello, 2003). Los AA ramificados además compiten con otros AA (especialmente triptófano y tirosina) para su transporte a través de las membranas celulares

(Blachier et al., 2013). En este estudio la CS de Trp y Tir fue similar en todos los tratamientos, por lo tanto, no afectaron negativamente el transporte y absorción de Leu, Iso y Val que se suplemento en la dieta. Leu, Val e Iso participan en la síntesis de proteínas y la eficiencia energética de estos AA corresponde al 47% en los animales (Wu, 2013).

La treonina de la dieta se utiliza preferentemente para síntesis de mucina, la principal proteína que recubre la mucosa intestinal por lo que su requerimiento y tasas de utilización se incrementan (Blachier et al., 2013), sobre todo en condiciones de EC. Debido a que la mucina se digiere y reutiliza poco (Fan et al., 2013), y a que Tre constituye cerca del 40% de la mucina, su requerimiento en intestino es alto (Blachier et al., 2013; Yang y Liao, 2019), lo que podría explicar su menor CS.

En intestino, Fen regula la absorción de AA, el transporte de este aminoácido disminuye en presencia de triptófano y metionina, tal como se observó en este estudio la CS de Fen disminuyó con las dietas enriquecidas con Met (Fan et al., 2013). Gln es abundante en plasma (Wu, 2013), la CS de Gln fue mayor en los tratamientos en EC, Gln proporciona energía a las células como los enterocitos, que se dividen rápidamente (Yang y Liao, 2019). Ser participa en la síntesis de Cis (Wu, 2009), cuando el consumo de proteína es bajo la síntesis de Ser ocurre a partir de intermedios de glucólisis donde se produce fosfoserina (Kohlmeier, 2015), el incremento en la CS de fosfoserina en los cerdos de los tratamientos en EC enriquecidos con Met podría indicar síntesis de Ser.

Carnosina es un dipéptido formado por histidina y alanina que se encuentra en altas concentraciones en hígado y músculo en mamíferos (Wu, 2013) y también es un antioxidante (Kohlmeier, 2015), sin embargo su menor CS en los tratamientos adicionados con Met, pueden evidenciar la mayor capacidad antioxidante de Met.

El ácido α -aminobutírico se deriva principalmente del catabolismo de la metionina, treonina y serina (Decker et al., 1995), probablemente la mayor CS de este metabolito en los cerdos alimentados con las dietas enriquecidas con Met este asociado al mayor consumo de Met en estos animales.

8. CONCLUSIONES

El uso de dietas enriquecidas con metionina para cerdos en condiciones de estrés por calor permite la recuperación de la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia, de manera similar a lo que ocurre en condiciones de termoneutralidad.

El nivel de metionina en la dieta modifica la expresión de los transportadores de aminoácidos, principalmente al incrementar la expresión de $b^{0,+}$ en yeyuno.

La adición de metionina a las dietas incrementa la disponibilidad de los aminoácidos (Lis, Tre, Val, Leu, Iso, His y Fen) para el crecimiento de los cerdos.

El mejor nivel de suplementación de metionina corresponde al 20 % por arriba del requerimiento reportado por el NRC.

9. LITERATURA CITADA

- Bauchart-Thevret, C., Stoll, B., and Burrin, D. G. (2009). Intestinal metabolism of sulfur amino acids. *Nutrition Research Reviews*, 22(2), 175-187. <https://doi.org/10.1017/S0954422409990138>
- Baumgard, L. H., and Rhoads, R. P. (2013). Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1(1), 311-337. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103644>
- Belhadj Slimen, I., Najar, T., Ghram, A., and Abdrrabba, M. (2016). Heat stress effects on livestock: Molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(3), 401-412. <https://doi.org/10.1111/jpn.12379>
- Bernabucci, U. (2012). Impact of Hot Environment on Nutrient Requirements. En R. J. Collier and J. L. Collier (Eds.), *Environmental Physiology of Livestock* (pp. 101-128). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781119949091.ch7>
- Blachier, F., Wu, G., and Yin, Y. (Eds.). (2013). *Nutritional and Physiological Functions of Amino Acids in Pigs*. Springer Vienna. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1328-8>
- Boudko, D. Y., Kohn, A. B., Meleshkevitch, E. A., Dasher, M. K., Seron, T. J., Stevens, B. R., and Harvey, W. R. (2005). Ancestry and progeny of nutrient amino acid transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(5), 1360-1365. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405183101>

- Bröer, S. (2008). Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiological Reviews*, 88(1), 249-286. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2006>
- Camargo, S. M. R., Singer, D., Makrides, V., Huggel, K., Pos, K. M., Wagner, C. A., Kuba, K., Danilczyk, U., Skovby, F., Kleta, R., Penninger, J. M., and Verrey, F. (2009). Tissue-Specific Amino Acid Transporter Partners ACE2 and Collectrin Differentially Interact With Hartnup Mutations. *Gastroenterology*, 136(3), 872-882.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.055>
- Cervantes, M., Antoine, D., Valle, J. A., Vásquez, N., Camacho, R. L., Bernal, H., and Morales, A. (2018). Effect of feed intake level on the body temperature of pigs exposed to heat stress conditions. *Journal of Thermal Biology*, 76, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.06.010>
- Cervantes, M., Cota, M., Arce, N., Castillo, G., Avelar, E., Espinoza, S., and Morales, A. (2016). Effect of heat stress on performance and expression of selected amino acid and glucose transporters, HSP90, leptin and ghrelin in growing pigs. *Journal of Thermal Biology*, 59, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.04.014>
- Cervantes, M., Ibarra, N., Vásquez, N., Reyes, F., Avelar, E., Espinoza, S., and Morales, A. (2017). Serum concentrations of free amino acids in growing pigs exposed to diurnal heat stress fluctuations. *Journal of Thermal Biology*, 69, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.06.008>
- Chen, Y., Li, D., Dai, Z., Piao, X., Wu, Z., Wang, B., Zhu, Y., and Zeng, Z. (2014). L-Methionine supplementation maintains the integrity and barrier function of the

small-intestinal mucosa in post-weaning piglets. *Amino Acids*, 46(4), 1131-1142. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1675-5>

Chiba, L. I. (2013). *Sustainable Swine Nutrition* (First). John Wiley & Sons, Inc.

Collin, A., Milgent, J. van, and Dividich, J. L. (2001). Modelling the effect of high, constant temperature on food intake in young growing pigs. *Animal Science*, 72(3), 519-527. <https://doi.org/10.1017/S1357729800052048>

Collin, A., van Milgen, J., Dubois, S., and Noblet, J. (2001). Effect of high temperature on feeding behaviour and heat production in group-housed young pigs. *The British Journal of Nutrition*, 86(1), 63-70. <https://doi.org/10.1079/bjn2001356>

Cottrell, J. J., Liu, F., Hung, A. T., DiGiacomo, K., Chauhan, S. S., Leury, B. J., Furness, J. B., Celi, P., and Dunshea, F. R. (2015). Nutritional strategies to alleviate heat stress in pigs. *Animal Production Science*, 55(12), 1391-1402. <https://doi.org/10.1071/AN15255>

da Fonseca de Oliveira, A. C., Vanelli, K., Sotomaior, C. S., Weber, S. H., and Costa, L. B. (2019). Impacts on performance of growing-finishing pigs under heat stress conditions: A meta-analysis. *Veterinary Research Communications*, 43(1), 37-43. <https://doi.org/10.1007/s11259-018-9741-1>

Decker, R., Stuckrad-Barre, S. v., Milakofsky, L., Hofford, J. M., Harris, N., and Vogel, W. H. (1995). Effect of stress on amino acids and related compounds in various tissues of the rat. *Life Sciences*, 57(19), 1781-1790. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02156-D](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02156-D)

D'Mello, J. P. F. (2003). *Amino acids in animal nutrition* (2nd ed). CABI Pub.

- Emery, P. W. (2012). Basic metabolism: Protein. *Surgery (Oxford)*, 30(5), 209-213.
<https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2012.02.008>
- Fan, Q., Yan, X., Yin, Y., and Liu, Z. (2013). Amino Acids, Gene Expression, and Cell Signaling in the Pig Intestine. En *Nutritional and Physiological Functions of Amino Acids in Pigs*. Springer Vienna. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1328-8>
- G. LeRoy Hahn, John B. Gaughan, Terry L. Mader, and Roger A. Eigenberg. (2009). Chapter 5: Thermal Indices and Their Applications for Livestock Environments. En G. LeRoy Hahn, John B. Gaughan, Terry L. Mader, and Roger A. Eigenberg, *Livestock Energetics and Thermal Environment Management* (1.^a ed., pp. 113-130). American Society of Agricultural and Biological Engineers. <https://doi.org/10.13031/2013.28298>
- Ganapathy, V. (2012). Protein Digestion and Absorption. En *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (pp. 1595-1623). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382026-6.00059-2>
- García-Villalobos, H., Morales-Trejo, A., Araiza-Piña, B. A., Htoo, J. K., and Cervantes-Ramírez, M. (2012). Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 66(4), 257-270. <https://doi.org/10.1080/1745039x.2012.697351>
- González, C. (2021). Optimizando la proteína de la dieta con valina como el siguiente aminoácido limitante [Divulgación]. Engormix.
- González, F. A. (2020). Efecto de suplementación de arginina sobre integridad intestinal y utilización de nutrientes en cerdos (*sus scrofa*) en crecimiento en

estrés por calor [MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL]. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

- Goodman, B. E. (2010). Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in Physiology Education*, 34(2), 44-53. <https://doi.org/10.1152/advan.00094.2009>
- Habeeb, A. A., Gad, A. E., and Atta, M. A. (2018). Temperature-Humidity Indices as Indicators to Heat Stress of Climatic Conditions with Relation to Production and Reproduction of Farm Animals. *International Journal of Biotechnology and Recent Advances*, 1(1), 35-50. <https://doi.org/10.18689/ijbr-1000107>
- Horowitz, M., Eli-Berchoer, L., Wapinski, I., Friedman, N., and Kodesh, E. (2004). Stress-related genomic responses during the course of heat acclimation and its association with ischemic-reperfusion cross-tolerance. *Journal of Applied Physiology*, 97(4), 1496-1507. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00306.2004>
- Huynh, T. T. T., Aarnink, A. J. A., Verstegen, M. W. A., Gerrits, W. J. J., Heetkamp, M. J. W., Kemp, B., and Canh, T. T. (2005). Effects of increasing temperatures on physiological changes in pigs at different relative humidities¹. *Journal of Animal Science*, 83(6), 1385-1396. <https://doi.org/10.2527/2005.8361385x>
- Hyde, R., Taylor, P. M., and Hundal, H. S. (2003). Amino acid transporters: Roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochemical Journal*, 373(1), 1-18. <https://doi.org/10.1042/bj20030405>
- Kerr, B. J., Yen, J. T., Nienaber, J. A., and Easter, R. A. (2003). Influences of dietary protein level, amino acid supplementation and environmental temperature on

- performance, body composition, organ weights and total heat production of growing pigs1. *Journal of Animal Science*, 81(8), 1998-2007.
<https://doi.org/10.2527/2003.8181998x>
- Kim, B., Kim, M., Kim, H. R., Ji, S. Y., Kim, K. H., Chun, J. L., Baek, Y.-C., Lee, Y., Jeong, J. Y., and Lee, S. D. (2020). Effect of acute heat stress on feed intake and plasma concentrations of tumor necrosis factor- α and free amino acids in growing pigs. *Korean Journal of Agricultural Science*, 47(3), 597-604.
<https://doi.org/10.7744/kjoas.20200047>
- Kitt, S. J., Miller, P. S., and Lewis, A. (s. f.). *Factors Affecting Small Intestine Development in Weanling Pigs*. 4.
- Kohlmeier, M. (2015). Amino Acids and Nitrogen Compounds (pp. 265-477).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387784-0.00008-0>
- Kong, S., Zhang, Y. H., and Zhang, W. (2018). Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *BioMed Research International*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/2819154>
- Krehbriel, C. R., and Matthews, J. R. (2003). Absorption of Amino Acids and Peptides. En J. P. F. D'Mello (Ed.), *Amino acids in animal nutrition* (2nd ed). CABI Pub.
- Kyriazakis, I., and Whittemore, C. T. (2006). Whittemore's science and practice of pig production (3rd ed). Blackwell Pub.
- Le Floc'h, N., Wessels, A., Corrent, E., Wu, G., and Bosi, P. (2018). The relevance of functional amino acids to support the health of growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 245, 104-116.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.09.007>

- Lewis, A. J. (2003). Methionine-cystine relationships in pig nutrition. En *Amino acids in animal nutrition* (Ed. JPF D'Mello). CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK (pp. 143-155).
- Lewis, A. J., and Southern, L. L. (2001). *Swine nutrition* (2nd ed). CRC Press.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Schnittger C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Majumder, M., Yaman, I., Gaccioli, F., Zeenko, V. V., Wang, C., Caprara, M. G., Venema, R. C., Komar, A. A., Snider, M. D., and Hatzoglou, M. (2009). The hnRNA-Binding Proteins hnRNP L and PTB Are Required for Efficient Translation of the Cat-1 Arginine/Lysine Transporter mRNA during Amino Acid Starvation. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2899-2912.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01774-08>
- Manno, M. C., Oliveira, R. F. M. de, Donzele, J. L., Oliveira, W. P. de, Vaz, R. G. M. V., Silva, B. A. N., Saraiva, E. P., and Lima, K. R. de S. (2006). Efeitos da temperatura ambiente sobre o desempenho de suínos dos 30 aos 60 kg. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(2), 471-477.
<https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000200019>
- Martínez, Y., Li, X., Liu, G., Bin, P., Yan, W., Más, D., Valdivié, M., Hu, C.-A. A., Ren, W., and Yin, Y. (2017). The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids*, 49(12), 2091-2098.
<https://doi.org/10.1007/s00726-017-2494-2>

- Mastrototaro, L., Sponder, G., Saremi, B., and Aschenbach, J. R. (2016). Gastrointestinal methionine shuttle: Priority handling of precious goods: Gastrointestinal Absorption of Methionine. *IUBMB Life*, 68(12), 924-934. <https://doi.org/10.1002/iub.1571>
- McDonald, P., and Sanz Arias, R. (2013). *Nutrición animal*. Acribia.
- Mejías, M., Molis, P., and Pombal, M. A. (2019). *Organos Animales: Sistema Digestivo.pdf*. Atlas de histología vegetal y animal. http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_inicio.php
- Montilla, S. I. R., Johnson, T. P., Pearce, S. C., Gardan-Salmon, D., Gabler, N. K., Ross, J. W., Rhoads, R. P., Baumgard, L. H., Lonergan, S. M., and Selsby, J. T. (2014). Heat stress causes oxidative stress but not inflammatory signaling in porcine skeletal muscle. *Temperature*, 1(1), 42-50. <https://doi.org/10.4161/temp.28844>
- Morales, A., Buenabad, L., Castillo, G., Arce, N., Araiza, B. A., Htoo, J. K., and Cervantes, M. (2015). Low-protein amino acid-supplemented diets for growing pigs: Effect on expression of amino acid transporters, serum concentration, performance, and carcass composition. *Journal of Animal Science*, 93(5), 2154-2164. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8834>
- Morales, A., Chávez, M., Vásquez, N., Camacho, L., Avelar, E., Arce, N., Htoo, J. K., and Cervantes, M. (2019). Extra dietary protein-bound or free amino acids differently affect the serum concentrations of free amino acids in heat-stressed pigs. *Journal of Animal Science*, 97(4), 1734-1744. <https://doi.org/10.1093/jas/skz037>

- Morales, A., Chávez, M., Vásquez, N., Htoo, J. K., Buenabad, L., Espinoza, S., and Cervantes, M. (2018). Increased dietary protein or free amino acids supply for heat stress pigs: Effect on performance and carcass traits. *Journal of Animal Science*, 96(4), 1419-1429. <https://doi.org/10.1093/jas/sky044>
- Morales, A., Cota, S. E. M., Ibarra, N. O., Arce, N., Htoo, J. K., and Cervantes, M. (2016c). Effect of heat stress on the serum concentrations of free amino acids and some of their metabolites in growing pigs¹. *Journal of Animal Science*, 94(7), 2835-2842. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0073>
- Morales, A., Gómez, T., Villalobos, Y. D., Bernal, H., Htoo, J. K., González-Vega, J. C., Espinoza, S., Yáñez, J., and Cervantes, M. (2020). Dietary protein-bound or free amino acids differently affect intestinal morphology, gene expression of amino acid transporters, and serum amino acids of pigs exposed to heat stress. *Journal of Animal Science*, 98(3). <https://doi.org/10.1093/jas/skaa056>
- Morales, A., Grageola, F., García, H., Arce, N., Araiza, B., Yáñez, J., and Cervantes, M. (2014). Performance, serum amino acid concentrations and expression of selected genes in pair-fed growing pigs exposed to high ambient temperatures. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98(5), 928-935. <https://doi.org/10.1111/jpn.12161>
- Morales, A., Hernández, L., Buenabad, L., Avelar, E., Bernal, H., Baumgard, L. H., and Cervantes, M. (2016b). Effect of heat stress on the endogenous intestinal loss of amino acids in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 94(1), 165-172. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9393>
- Morales, A., Pérez, M., Castro, P., Ibarra, N., Bernal, H., Baumgard, L. H., and Cervantes, M. (2016a). Heat stress affects the apparent and standardized

ileal digestibilities of amino acids in growing pigs¹. *Journal of Animal Science*, 94(8), 3362-3369. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0571>

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario oficial.

NRC. (2012). Nutrient Requirements of Swine (11.^a ed.). The National Academies Press.

Oliveira, R. F., Moreira, R. H. R., Ribeiro, B. P. V. B., Resende, M., Chaves, R. F., Gionbelli, M. P., and Ferreira, R. A. (2019). O estresse térmico agudo compromete a fisiologia dos suínos em crescimento. *Archivos de Zootecnia*, 68(262), 300-302. <https://doi.org/10.21071/az.v68i262.4150>

Oltjen, J. W., Kebreab, E., and Lapierre, H. (Eds.). (2013). *Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production* (Vol. 134). Wageningen Academic Publishers. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-781-3>

Palacín, M., Fernández, E., Chillarón, J., and Zorzano, A. (2001). The amino acid transport system b⁰⁺ and cystinuria. *Molecular Membrane Biology*, 18(1), 21-26. <https://doi.org/10.1080/09687680010028771>

Patience, J. F. (2012). Feed efficiency in swine. Wageningen Academic Publ.

Patience, J. F., Rossoni-Serão, M. C., and Gutiérrez, N. A. (2015). A review of feed efficiency in swine: Biology and application. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0031-2>

Patience, J. F., Umboh, J. F., Chaplin, R. K., and Nyachoti, C. M. (2005). Nutritional and physiological responses of growing pigs exposed to a diurnal pattern of

- heat stress. *Livestock Production Science*, 96(2-3), 205-214.
<https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.01.012>
- Pearce, S. C., Gabler, N. K., Ross, J. W., Escobar, J., Patience, J. F., Rhoads, R. P., and Baumgard, L. H. (2013). The effects of heat stress and plane of nutrition on metabolism in growing pigs¹. *Journal of Animal Science*, 91(5), 2108-2118. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5738>
- Pearce, S. C., Mani, V., Boddicker, R. L., Johnson, J. S., Weber, T. E., Ross, J. W., Baumgard, L. H., and Gabler, N. K. (2012). Heat stress reduces barrier function and alters intestinal metabolism in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 90 Suppl 4, 257-259. <https://doi.org/10.2527/jas.52339>
- Pearce, S. C., Sanz-Fernandez, M. V., Hollis, J. H., Baumgard, L. H., and Gabler, N. K. (2014). Short-term exposure to heat stress attenuates appetite and intestinal integrity in growing pigs¹. *Journal of Animal Science*, 92(12), 5444-5454. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8407>
- Pfeiffer, R., Rossier, G., Spindler, B., Meier, C., Kühn, L., and Verrey, F. (1999). Amino acid transport of y⁺L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *The EMBO Journal*, 18(1), 49-57. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.49>
- Pond, W. G., Church, D. C., and Pond, K. R. (2012). *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales*. Limusa.
- Renaudeau, D., Anais, C., Tel, L., and Gourdine, J. L. (2010). Effect of temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using a nonlinear function¹. *Journal of Animal Science*, 88(11), 3715-3724.
<https://doi.org/10.2527/jas.2009-2169>

- Renaudeau, D., Gilbert, H., and Noblet, J. (2012). Effect of climatic environment on feed efficiency in swine. En J. F. Patience (Ed.), *Feed efficiency in swine* (pp. 183-210). Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-756-1_9
- Renaudeau, D., Huc, E., and Noblet, J. (2007). Acclimation to high ambient temperature in Large White and Caribbean Creole growing pigs¹. *Journal of Animal Science*, 85(3), 779-790. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-430>
- Renaudeau, D., Kerdoncuff, M., Anaïs, C., and Gourdine, J. L. (2008). Effect of temperature level on thermal acclimation in Large White growing pigs. *Animal*, 2(11), 1619-1626. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002814>
- Riedijk, M. A., Stoll, B., Chacko, S., Schierbeek, H., Sunehag, A. L., van Goudoever, J. B., and Burrin, D. G. (2007). Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3408-3413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607965104>
- Rius, A. G. (2019). Invited Review: Adaptations of protein and amino acid metabolism to heat stress in dairy cows and other livestock species. *Applied Animal Science*, 35(1), 39-48. <https://doi.org/10.15232/aas.2018-01805>
- Ross, J. W., Hale, B. J., Gabler, N. K., Rhoads, R. P., Keating, A. F., and Baumgard, L. H. (2015). Physiological consequences of heat stress in pigs. *Animal Production Science*, 55(12), 1381. <https://doi.org/10.1071/AN15267>
- Rothfusz, L. P. (1990). *The Heat Index «Equation» (or, More Than You Ever Wanted to Know About Heat Index)*. Tech. Attachment, SR/SSD 90-23, NWS.

- Santos, L. S. D., Pomar, C., Campos, P. H. R. F., da Silva, W. C., Gobi, J. de P., Veira, A. M., Fraga, A. Z., and Hauschild, L. (2018). Precision feeding strategy for growing pigs under heat stress conditions. *Journal of Animal Science*, 96(11), 4789-4801. <https://doi.org/10.1093/jas/sky343>
- Schindeldecker, M., and Moosmann, B. (2015). Protein-borne methionine residues as structural antioxidants in mitochondria. *Amino Acids*, 47(7), 1421-1432. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1955-8>
- Tabiri, H. Y., Sato, K., Takahashi, K., Toyomizu, M., and Akiba, Y. (2000). Effect of Acute Heat Stress on Plasma Amino Acids Concentration of Broiler Chickens. *Japanese Poultry Science*, 37(2), 86-94. <https://doi.org/10.2141/jpsa.37.86>
- Tajima, K., and Aminov, R. (2015). Structure and Function of a Nonruminant Gut: A Porcine Model. En A. K. Puniya, R. Singh, and D. N. Kamra (Eds.), *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (pp. 47-75). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3_5
- Taniguchi, N. (2008). Aminoácidos y proteínas. En J. Baynes and M. Dominiczak (Eds.), *Bioquímica médica* (pp. 5-6). Elsevier.
- Thomson, J. R., and Friendship, R. M. (2019). Digestive System. En J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, and J. Zhang (Eds.), *Diseases of Swine* (pp. 234-263). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch15>
- Tian, Q. Y., Zeng, Z. K., Zhang, Y. X., Long, S. F., and Piao, X. S. (2016). Effect of L- or DL-methionine Supplementation on Nitrogen Retention, Serum Amino Acid Concentrations and Blood Metabolites Profile in Starter Pigs. *Asian-*

Australasian Journal of Animal Sciences, 29(5), 689-694.
<https://doi.org/10.5713/ajas.15.0730>

Trottier, N. L., and Manjarín, R. (2012). Amino Acids and Amino Acid Utilization in Swine. En L. I. Chiba (Ed.), *Sustainable Swine Nutrition* (pp. 81-108). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118491454.ch4>

Vandelannoote, L., Vermeer, H., Fabrega, Romans, E., and Malak-Rawlikowska, A. (2012). *Challenge: Solutions for Heat Stress*.

Wang, Y., Yin, X., Yin, D., Lei, Z., Mahmood, T., and Yuan, J. (2019). Antioxidant response and bioavailability of methionine hydroxy analog relative to DL-methionine in broiler chickens. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, 5(3), 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.06.007>

Wilson, T. E., and Crandall, C. G. (2011). Effect of Thermal Stress on Cardiac Function: *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 39(1), 12-17. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e318201eed6>

Wolp, R. C., Rodrigues, N. E. B., Zangeronimo, M. G., Cantarelli, V. S., Fialho, E. T., Philomeno, R., Alvarenga, R. R., and Rocha, L. F. (2012). Soybean oil and crude protein levels for growing pigs kept under heat stress conditions. *Livestock Science*, 147(1-3), 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.04.014>

Wu, G. (2009). Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>

Wu, G. (2013). *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition*. CRC Press.

Xin, H., and Harmon, J. D. (1998). *Livestock industry facilities and environment: Heat stress indices for livestock*.

- Yang, Z., and Liao, S. F. (2019). Physiological Effects of Dietary Amino Acids on Gut Health and Functions of Swine. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00169>
- Yen, J.-T. (2000). Anatomy of the Digestive System and Nutritional Physiology. En A. Lewis and L. Lee Southern (Eds.), *Swine Nutrition, Second Edition*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420041842.ch3>
- Yu, J., Yin, P., Liu, F., Cheng, G., Guo, K., Lu, A., Zhu, X., Luan, W., and Xu, J. (2010). Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and gene expression study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 156(1), 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.008>
- Zhang, H., Li, Y., Chen, Y., Ying, Z., Su, W., Zhang, T., Dong, Y., Htoo, J. K., Zhang, L., and Wang, T. (2019). Effects of dietary methionine supplementation on growth performance, intestinal morphology, antioxidant capacity and immune function in intra-uterine growth-retarded suckling piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(3), 868-881. <https://doi.org/10.1111/jpn.13084>
- Zhang, S., Saremi, B., Gilbert, E. R., and Wong, E. A. (2017). Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers. *Poultry Science*, 96(2), 425-439. <https://doi.org/10.3382/ps/pew253>
- Zhang, S., Wong, E. A., and Gilbert, E. R. (2015). Bioavailability of different dietary supplemental methionine sources in animals. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 7, 478-490.

Zumbach, B., Misztal, I., Tsuruta, S., Sanchez, J. P., Azain, M., Herring, W., Holl, J., Long, T., and Culbertson, M. (2008). Genetic components of heat stress in finishing pigs: Parameter estimation. *Journal of Animal Science*, 86(9), 2076-2081. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0282>