

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

POSGRADO CONJUNTO EN CIENCIA ANIMAL



**EFFECTO DE SUPLEMENTACIÓN DE ARGININA SOBRE INTEGRIDAD
INTESTINAL Y UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES EN CERDOS (*Sus
scrofa*) EN CRECIMIENTO EN ESTRÉS POR CALOR**

TESIS

QUE PRESENTA

FERNANDA GONZÁLEZ ARAGÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

**EFFECTO DE SUPLEMENTACIÓN DE ARGININA SOBRE INTEGRIDAD INTESTINAL
Y UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES EN CERDOS (*Sus scrofa*) EN CRECIMIENTO EN
ESTRÉS POR CALOR**

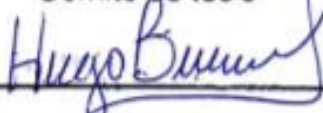
TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

PRESENTA

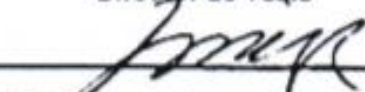
ING. FERNANDA GONZÁLEZ ARAGÓN

Comité de tesis



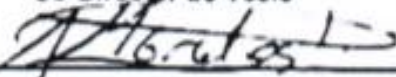
Dr. sc. agr. Hugo Bernal Barragán

Director de Tesis



Ph. D. Miguel Cervantes Ramirez

Co-Director de Tesis



Dra. Adriana Morales Trejo

Co-Director de Tesis



Ph. D. Luis Edgar Rodriguez Tovar

Co-Director de Tesis



Dr. Fernando Sanchez Dávila

Co-Director de Tesis



Dr. Néstor Arce Vázquez

Co-Director de tesis

DEDICATORIA

A:

Mi familia Fernando, Teresa y Emiliano, que siempre estuvieron conmigo para apoyarme incondicionalmente para cumplir mis metas propuestas.

Mi tía Blanca Lilia, que me ayuda siempre cuando necesito algo, así como en tiempos de estrés, guiándome para mejorar.

Mis amigos y compañeros, los cuales convivimos mucho durante esta etapa y nos apoyamos para salir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Hugo Bernal, por aceptarme para participar como tesista, por apoyarme cada vez que tuviera un problema y sus observaciones para mejorar como estudiante y profesionalista.

Dra. Adriana Morales y Dr. Miguel Cervantes, por aceptarme en su cuerpo académico, permitirme hacer el experimento en la UABC, solucionarme mis dudas, confiar en mi para exponer en los congresos y principalmente dejarme trabajar en su laboratorio, en el cual me proporcionaron todo lo que necesitaba para cumplir los objetivos de mi trabajo.

Dr. Luis Edgar, por contar con su apoyo cuando lo necesitaba y prestarme sus instalaciones para llevar a cabo parte de mi trabajo experimental.

Dr. Fernando Sánchez, por ayudarme en la escritura de mi tesis desde que nos impartió la materia de Seminario y darme consejos para poder mejorar el escrito.

Dr. Néstor Arce por ayudarme a mejorar en ciertos puntos débiles de mi carrera, como el manejo de los animales en la granja, y ayudarme en todo lo que necesitaba, principalmente dudas acerca de temas relacionados a mi proyecto de tesis.

Dra. Nydia Vásquez por brindarme de tu ayuda en prácticamente todo y brindarme tu amistad en esta etapa que convivimos juntas.

Dr. Ernesto Avelar, Dra. Lucero Camacho, Dr. Lorenzo Buenabad y M.C. Salvador Espinoza por ayudarme en mi etapa experimental e incluirme en el cuerpo académico.

Alan Valle y Ana Muñoz por brindarme su amistad y apoyo en todo lo que necesitara en Mexicali y estar siempre al pendiente de mi trabajo.

Davidson, Duckens y Arturo por ayudarme a manejar los cerdos de mi experimentación y estar disponibles para cuando lo necesitara.

A CONACyT y PAICYT (UANL), por su apoyo económico durante estos dos años de investigación.

ABREVIATURAS

EC	Estrés por calor
TN	Termoneutralidad
AA	Aminoácidos
CS	Concentración sérica
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ONS	Óxido nítrico sintasa
ON	Óxido nítrico
ASS	Arginina succinato sintasa
ASL	Arginina succinato liasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
SSAT	Espermidina-espermina-acetiltransferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ITH	Índice de temperatura y humedad
mm	Milímetros
V:C	Relación velloidad-cripta
mg	Miligramos
μl	Microlitro
μg	Microgramo
nm	Nanómetro
U/μl	Unidad por microlitro
ng/μl	Nanogramo por microlitro
μM	Micromolar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de cuadros	vi
Índice de figuras	viii
Resumen	x
Abstract	xii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	3
2.1. Estrés por calor y sus efectos en cerdos.....	3
2.2. ¿Qué son los aminoácidos?	4
2.3. Aminoácidos en cerdos expuestos a estrés por calor	5
2.4. Arginina	7
2.5. Transporte de arginina en células	9
2.6. Sistema b ^{0,+} AT/RBAT	10
2.7. Sistema B0 AT-1	11
2.8. Sistema γ -L-1/4F2HC	11
2.9. Síntesis de poliaminas	12
3. Justificación.....	15
3.1. Hipótesis	15
3.2. Objetivos del trabajo.....	16
3.2.1. Objetivo general	16
3.2.2. Objetivos específicos	16
4. Materiales y métodos	17
4.1. Lugar del experimento.....	17
4.2. Instalaciones y distribución	17
4.3. Animales, dietas y procedimiento experimental	17
4.4. Toma de muestras	20
4.5. Análisis de composición química de las dietas.....	21
4.6. Análisis de aminoácidos en suero sanguíneo y dietas	22
4.7. Análisis de morfología intestinal	23
4.8. Medición de altura y ancho de vellosidades y profundidad de la cripta.....	26
4.9. Extracción total de RNA y purificación	27

4.10. Transcripción reversa.....	28
4.11. PCR cuantitativo (qPCR).....	29
4.12. Análisis estadístico.....	32
5. Resultados y discusión.....	33
5.1. Temperatura ambiental y humedad relativa.....	33
5.2. Índice de temperatura y humedad.....	34
5.3. Composición química del alimento.....	36
5.4. Parámetros productivos.....	36
5.5. Frecuencia respiratoria.....	39
5.6. Composición de aminoácidos en suero sanguíneo.....	41
5.7. Análisis de morfología intestinal.....	44
5.8. Expresión relativa de transportadores de aminoácidos.....	48
5.9. Expresión relativa de enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas.....	53
6. Conclusiones.....	57
7. Literatura citada.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

	Cuadro	Página
1.	Composición de las dietas experimentales (As Is Basis).	19
2.	Protocolo de deshidratación de las muestras de tejido intestinal.	23
3.	Protocolo de aclaración con xilol de las muestras de tejido intestinal.	24
4.	Protocolo de tinción (hematoxilina y eosina) de los tejidos intestinales.	25
5.	Oligonucleótidos utilizados para análisis de PCR cuantitativo de mRNA derivados de transportadores de aminoácidos (b ^{0,+} , B0 y y+L), enzimas asociadas al metabolismo de arginina y poliaminas (ASS, ODC y SSAT) y RPL4.	31
6.	Composición química en las dietas (Base MS).	36
7.	Peso vivo, ganancia de peso, consumo de alimento y eficiencia alimenticia de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.....	37
8.	Composición de aminoácidos esenciales (µg/ml) en suero analizados en los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor	41
9.	Composición de aminoácidos no esenciales (µg/ml) en suero analizados en los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor	42
10.	Mediciones morfológicas (µm) de vellosidades de las muestras de intestino delgado de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.....	45

11.	Relación altura de vellosidad:profundidad de cripta (V:C) de las muestras de intestino delgado de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.	46
------------	--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Figura	Página
1.	Sistemas de transporte de arginina en enterocitos: b ^{0,+} (color verde) y B0 (color morado) en el área apical. El transportador y+L (color rojo) se observa en el área basolateral. AA+, aminoácidos catiónicos; AA0, aminoácidos neutros; y Na ⁺ , sodio (Palacín <i>et al.</i> , 2005).	10
2.	Ruta metabólica para la síntesis de arginina y poliaminas. ADC, arginina descarboxilasa; AGAT, arginina-glicina amidinotransferasa; ASL, arginina succinato liasa; ASS, arginina succinato sintasa; NOS, óxido nítrico sintasa; OAT, ornitina aminotransferasa; ODC, ornitina descarboxilasa; P5CDH, pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa; P5CS, pirrolina-5-carboxilato sintasa; SSAT, espermidina/espermina-N1-acetiltransferasa (Wu <i>et al.</i> , 2009; Lam <i>et al.</i> , 2018).	14
3.	Ejemplo de medición de la longitud (flecha amarilla) y profundidad de cripta (flecha azul), de una vellosidad seleccionada, utilizando el programa Image J de un corte histológico de intestino delgado. Las flechas negras indican ancho de la vellosidad y cripta.	27
4.	Variación de la temperatura y humedad durante las 24 h del día. Los valores mostrados para cada hora corresponden a las medias de los datos obtenidos de los 21 días del experimento.	33
5.	Variación del índice de temperatura y humedad durante las 24 h del día. Los valores mostrados para cada hora corresponden a las medias de los datos obtenidos de los 21 días del experimento.	35
6.	Frecuencia respiratoria (eventos/min) medida a 0700 h y 1600 h (P<0.1) de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.	39
7.	Expresión relativa (2 ^{-ΔΔCt}) de mRNA que codifica para transportadores de aminoácidos y+L (P=0.096), B0 (P=0.141) y b ^{0,+} (P=0.016) en duodeno de los cerdos alimentados con una dieta	

	estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.	48
8.	Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de mRNA que codifica para transportadores de aminoácidos y+L (P=0.722), B0 (P=0.969) y b ^{0,+} (P=0.610) en yeyuno de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.	49
9.	Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de mRNA que codifica para transportadores de aminoácidos y+L (P=0.415), B0 (P=0.811) y b ^{0,+} (P=0.446) en íleon de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.	50
10.	Enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas. ASS, arginina succinato sintasa; ODC ornitina descarboxilasa; y SSAT, espermina/espermidina acetiltransferasa (Lam <i>et al.</i> , 2018).	53
11.	Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de mRNA que codifica para enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas SSAT (P>0.05), ODC (P>0.05) y ASS (P>0.05) en duodeno, yeyuno e íleon de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.	54

RESUMEN

El crecimiento de cerdos es afectado cuando se presentan condiciones de estrés por calor, dado que el incremento de la temperatura ambiental se asocia principalmente con una reducción del consumo de alimento y, por lo tanto, de nutrientes. Existen estudios que indican que la suplementación con aminoácidos cristalinos puede ayudar a aliviar los efectos negativos causados por el estrés por calor.

Arginina es un aminoácido catiónico considerado esencial bajo condiciones de estrés severo. Es precursor del óxido nítrico (principal vasodilatador) y de poliaminas, esenciales en la diferenciación y proliferación de células en el epitelio intestinal.

Se especula que la inclusión de arginina libre en la dieta de cerdos bajo condiciones de estrés por calor podría ayudar a corregir problemas asociados al estrés por calor.

En el presente estudio, veinte cerdos (25.4 ± 0.064 kg), alojados individualmente en condiciones de temperatura ambiente durante el verano de Mexicali, Baja California (la temperatura ambiental promedio fue entre 30.0 y 36.4°C y una humedad relativa entre 58 y 79%), fueron asignados durante 21 días a dos tratamientos: 1) cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) y 2) cerdos alimentados con la misma dieta estándar adicionada con 0.20% de arginina cristalina (Est+Arg).

Aunque las dietas evaluadas mostraron resultados similares del consumo de alimento ($P=0.875$), ganancia diaria de peso ($P=0.815$) y conversión alimenticia ($P=0.896$), la frecuencia respiratoria registrada a las 0700 h (temperatura mínima del día) fue tendencialmente menor ($P=0.078$), para cerdos alimentados con Est+Arg que para los cerdos Est (54 vs 69 respiraciones por minuto).

Muestras de sangre tomadas por venipunción fueron analizadas para evaluar la concentración sérica de aminoácidos. Se registró mayor concentración de arginina ($P<0.01$), histidina, metionina, treonina, triptofano ($P<0.05$) y una menor concentración de alanina ($P<0.05$) en los cerdos tratados con Est+Arg que en los cerdos Est.

Muestras de intestino delgado obtenidas al final del período experimental de 21 días, fueron analizadas para evaluar la altura de las vellosidades, profundidad de la cripta y la expresión de transportadores de aminoácidos y enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas en mucosa. Los cerdos Est+Arg tuvieron vellosidades con mayor altura ($P < 0.05$) en los tres segmentos (duodeno, yeyuno e íleon) del intestino delgado que los cerdos alimentados con Est.

La expresión relativa del transportador de aminoácidos ($b^{0,+}$) en membrana apical de enterocitos del duodeno fue mayor ($P < 0.05$) en los cerdos alimentados con Est+Arg. La expresión relativa de las enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas fue similar ($P > 0.05$) entre tratamientos.

En conclusión, las dietas suplementadas con arginina cristalina tuvieron un efecto positivo en la morfología intestinal, concentración sérica de ciertos aminoácidos y abundancia de transportadores en duodeno de cerdos expuestos a estrés por calor, sin que se registraran diferencias en variables de eficiencia de crecimiento debidas a esta adición de arginina.

ABSTRACT

The growth of pigs is affected when heat stress conditions occur, because the increased temperature is mainly associated with reduced feed and nutrient intake. Several studies indicate that crystalline amino acid supplementation can help alleviate the negative effects caused by heat stress.

Arginine is a cationic amino acid considered essential under severe stress conditions. It is a precursor of nitric oxide (main vasodilator) and polyamines, essential in the differentiation and proliferation of cells in the intestinal epithelium. It is speculated that the inclusion of crystalline arginine in pig's diet under heat stress conditions could help amend problems associated with heat stress.

In this study, twenty pigs (25.4 ± 0.064 kg), housed individually in ambient temperature conditions during the summer in Mexicali, Baja California, (average ambient temperature was between 30.0 and 36.4 °C and the relative humidity between 58 and 79%), were assigned during 21 days to two treatments: 1).- pigs fed with a standard diet (Est) and 2).- pigs fed with the same standard diet added with 0.20% crystalline arginine (Est+Arg).

Even though evaluated diets showed similar results in feed intake ($P=0.875$), average daily weight gain ($P=0.815$) and feed conversion ($P=0.896$), the respiratory rate recorded at 0700 h (by the lowest daily temperature) was tendentially lower ($P=0.078$) for pigs fed Est+Arg than for pigs fed Est (values of 54 vs 69 braths per minute).

Blood samples taken by venipuncture were analyzed to evaluate amino acid concentrations in serum. Serum of Est+Arg pigs had higher concentration of arginine ($P<0.01$), histidine, methionine, threonine, tryptophan ($P<0.05$), and lower concentration for alanine ($P<0.05$) than in pigs fed Est.

Samples of the small intestine were obtained at the end of the experimental period to evaluate villus height, crypt depth and the expression of amino acid transporters and enzymes associated with arginine and polyamines synthesis in mucosa. Pigs fed Est+Arg had higher villi ($P <0.05$) in the three small intestine segments (duodenum, jejunum and ileum) than pigs fed Est.

The relative expression of the amino acid transporter (b^{0,+}) in apical membrane of duodenal enterocytes, was higher (P<0.05) in pigs fed with Est+Arg. Relative expression of enzymes associated with synthesis of arginine and polyamines was similar (P>0.05) between treatments.

In conclusion, diets supplemented with crystalline arginine had a positive effect on intestinal morphology, blood serum concentration of certain amino acid and duodenal abundance of amino acid transporters in pigs exposed to heat stress, however, variables related to growth efficiency of pigs were similar between diets.

1. INTRODUCCIÓN

Existe una creciente preocupación debido a las pérdidas económicas provocadas por la temperatura ambiental elevada existente en la última década, no sólo en las zonas tropicales, en las que el problema es recurrente, sino también en las zonas templadas, en las cuales, el aumento de temperatura es un problema ocasional durante el verano. Según la FAO (2010), más de un 50% de la producción porcina en el mundo es llevada a cabo en regiones tropicales o subtropicales, en las que se ha tenido una creciente demanda de carne de cerdo y un mayor consumo de proteína animal por habitante en estas regiones.

El estrés por calor ha causado pérdidas económicas considerables en Estados Unidos, Brasil, Australia, ciertos países de Europa y en otros países, en donde la producción porcina es predominante (St-Pierre *et al.*, 2003).

El estrés por calor puede ser considerado como una acumulación de calor en un cuerpo provocado por el contacto con las condiciones ambientales y es incapaz de mantener una temperatura confort

El proceso de la termorregulación del cerdo tiende a dificultarse cuando se encuentran en condiciones de temperatura ambiental elevada, en comparación con otros mamíferos, dado que las glándulas sudoríparas de los cerdos son muy pequeñas, lo cual crea una imposibilidad de perder calor por medio de la sudoración (Wolp *et al.*, 2012).

El estrés por calor es un factor muy importante en la producción del cerdo, debido a que ocasiona efectos como aumento de temperatura corporal (hasta 43°C), reducción de consumo de alimento, mayor frecuencia respiratoria (hasta 150 respiraciones por minuto) y frecuencia cardíaca, además de que existe redirección de su flujo sanguíneo de órganos internos a la periferia para favorecer la pérdida de calor (Collin *et al.*, 2001; Renaudeau *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2017).

Estos efectos negativos ocasionados por el estrés por calor desencadenan afecciones en el sistema digestivo. El redireccionamiento del flujo sanguíneo hacia la periferia puede llegar a provocar una falta de nutrientes provenientes del flujo arterial,

ocasionando daño epitelial, hipoxia y atrofia. También, la altura de las vellosidades y profundidad de criptas tiende a reducirse y, por lo tanto, el área de absorción de nutrientes disminuye. Lo anterior se encuentra relacionado a una reducción de concentración sérica de diversos aminoácidos (Yu *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2016b).

Previos estudios (Patience *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018) indican que aminoácidos cristalinos adicionados a las dietas, ayudan a aliviar los efectos del estrés por calor en cerdos, creando modificaciones celulares y moleculares que conllevan a una aclimatación, hasta cierto grado, al calor. Por ejemplo, la arginina se convierte en un aminoácido esencial en condiciones de estrés severo, ya que participa en el metabolismo de células intestinales y ayuda a la proliferación celular al ser precursor de poliaminas, produciendo un probable aumento en la altura de las vellosidades y criptas más profundas en el intestino delgado (Flynn *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2009). También, es precursor de óxido nítrico, metabolito que tiene función de vasodilatación y de creatina, formadora de agentes antioxidantes (Hall *et al.*, 2001).

Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo obtener información de las posibles respuestas causadas en condiciones de estrés por calor en cerdos en crecimiento, y determinar si la suplementación de arginina cristalina puede ayudar a superar la integridad intestinal causada por el estrés por calor en cerdos en crecimiento.

2. ANTECEDENTES

2.1. Estrés por calor y sus efectos en cerdos

El estrés por calor (EC) es una alta carga de calor que recibe y acumula el cuerpo de un individuo provocado por el contacto con las condiciones ambientales y es incapaz de mantener una temperatura confort (IPCC, 2018).

La exposición de cerdos a temperaturas ambiente elevadas, mayores a las de su zona de termoneutralidad (TN) (16 - 24 °C), resulta en la generación de EC (Noblet *et al.*, 1994).

El EC tiene como consecuencia importantes cambios en el comportamiento, en procesos fisiológicos, inmunológicos y metabólicos de los animales (Horowitz *et al.*, 2004; Cervantes *et al.*, 2016). La reducción del consumo de alimento es considerada como un impacto mayor del EC, debido a su repercusión con un menor consumo de nutrientes, que conlleva a un rendimiento desfavorable (Renaudeau *et al.*, 2014).

Se considera que la reducción del consumo de alimento de animales en condiciones de EC es una medida consecuente para contribuir a reducir este estrés, ya que la digestión y el metabolismo de los nutrientes producen calor (Noblet *et al.*, 1994) que incrementa la temperatura corporal (hasta >39 °C), que agrava el EC (Renaudeau *et al.*, 2010).

Se ha reportado que el EC en cerdos puede afectar algunas de sus constantes fisiológicas, por ejemplo, incrementa la frecuencia respiratoria (Patience *et al.*, 2005), el ritmo cardiaco y el flujo sanguíneo periférico (Wilson y Crandall, 2011) en un intento por disipar el calor y reducir la carga del calor producido dentro del cuerpo (Bernabucci *et al.*, 2009).

El EC provoca una vasodilatación que incrementa el flujo sanguíneo periférico y a su vez disminuye la irrigación hacia órganos viscerales como intestino delgado, provocando con ello, que se reduzca la cantidad de oxígeno que llega por el torrente sanguíneo a los órganos, dando como resultado una hipoxia (Hall *et al.*, 2001). Por ello, diversos estudios han indicado que animales bajo condiciones de EC tienden a tener

vellosidades intestinales reducidas en cantidad y altura, así como la profundidad de la cripta (Yu *et al.*, 2010; Cui y Gu, 2015).

Este daño en el epitelio intestinal debido al EC tiene como consecuencia alteraciones en sus funciones e incremento en la permeabilidad intestinal, lo cual puede dar paso a agentes infecciosos y toxinas por un daño estructural (Yu *et al.*, 2010). Así se han reportado cambios en la presencia de transportadores de nutrientes (Sonna *et al.*, 2002; Cervantes *et al.*, 2016), marcadores de estrés oxidativo (Hall *et al.*, 2001) y un aumento en la síntesis de proteínas de choque térmico (Sonna *et al.*, 2002; Cervantes *et al.*, 2016), catalogados como cambios en la expresión genética del animal (Sonna *et al.*, 2002).

Todos estos efectos tienen como consecuencia una afectación en el rendimiento y producción del animal (Liu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010). Estas alteraciones se ven reflejadas en pérdidas económicas que afectan a una gran parte de la producción porcina en diversas áreas del mundo cuando los cerdos son alojados (temporal o permanentemente), bajo condiciones de EC (St-Pierre *et al.*, 2003).

Previos estudios han propuesto como estrategia el uso de aminoácidos (AA) cristalinos para ayudar a mitigar algunos de estos efectos negativos producidos por el EC (Li *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009). El uso de AA cristalinos tiene como finalidad reducir los niveles de proteína en el alimento, que es uno de los principales componentes generadores de calor de la digestión (Ferreira *et al.*, 2007). Además, los AA cristalinos se absorben a una velocidad relativamente rápida al entrar al tracto intestinal (Frenhani y Burini, 1999), lo cual puede reducir la pérdida de AA endógenos causada por el EC (Morales *et al.*, 2016a).

2.2. ¿Qué son los aminoácidos?

Los AA son moléculas que se unen para formar péptidos y proteínas. Se conocen 20 AA que forman parte estructural de las proteínas (McDonald *et al.*, 2010). Los AA tienen en su estructura general al menos un grupo amino (-NH₂), un hidrógeno (-H), un

grupo carboxilo (-COOH), y una cadena lateral (-R) específica para cada AA (McDonald *et al.*, 2010).

Los AA se clasifican de acuerdo a las necesidades fisiológicas de los animales, en esenciales y no esenciales. Los AA esenciales no pueden ser sintetizados por el organismo en las cantidades que el mismo requiere. Esto implica que estos AA deben ser obtenidos o proporcionados en las dietas (McDonald *et al.*, 2010). Los AA esenciales para la mayoría de los animales son: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. En el caso de arginina e histidina, el animal puede sintetizarlos, pero en cantidades insuficientes para satisfacer los requerimientos nutricionales (McDonald *et al.*, 2010; Rezaei *et al.*, 2013).

Los AA no esenciales son aquellos que el animal sí puede sintetizar en cantidades requeridas por el organismo. Éstos no requieren ser proporcionados en las dietas (Rezaei *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013), pero son adicionados debido a que forman parte de las proteínas en los nutrientes. Los AA no esenciales son: alanina, asparagina, aspartato, cisteína, glicina, glutamato, glutamina, prolina, serina y tirosina (McDonald *et al.*, 2010; Rezaei *et al.*, 2013).

Algunos AA son considerados funcionales al participar en la síntesis de hormonas, como tetrayodotironina (T₄) y catecolaminas (Heger *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2009), precursoras de moléculas (otros AA, antioxidantes, NO, poliaminas, hormonas y enzimas), expresión y regulación génica (transcripción y estabilización de mRNA e incremento o disminución de la traducción) (Wu *et al.*, 2009), intermediarios metabólicos (ciclo de la urea, ciclo de Krebs y glucólisis) (Wu *et al.*, 2009; Kiriya y Nochi, 2016).

2.3. Aminoácidos en cerdos expuestos a estrés por calor

Se ha reportado que en cerdos expuestos a EC se reduce la altura de las vellosidades intestinales (Liu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010) lo que puede modificar en la expresión de sus transportadores de AA en epitelio intestinal (Morales *et al.*, 2014b;

Cervantes *et al.*, 2016); y que estos cambios, además pueden alterar la concentración sérica (CS) de AA (Morales *et al.*, 2014b; Morales *et al.*, 2016b).

Arginina y metionina son AA importantes involucrados en el sistema antioxidante celular, al ser dos de tres precursores de la creatina, que aumenta la capacidad antioxidante de la célula, misma que ha sido medida como actividades equivalentes de la catalasa y el superóxido dismutasa (Lawler *et al.*, 2001).

La metionina también es reconocida como un antioxidante, ya sea como un AA libre o como parte de las proteínas mitocondriales ricas en metionina (Moskovits *et al.*, 2001; Schindeldecker y Moosmann, 2015).

Las mitocondrias son organelos, en donde la mayoría de las especies reactivas de oxígeno (ROS) es producida. La reducción de la altura de las vellosidades intestinales en cerdos EC ha sido asociada a un incremento en la producción de ROS y estrés oxidativo (Pearce *et al.*, 2014). Aparentemente la disminución de la altura de las vellosidades intestinales, el incremento del estrés oxidativo y la modificación en las CS de arginina y metionina en cerdos EC se encuentran interrelacionadas (Morales *et al.*, 2016).

El suministro de arginina y metionina en la dieta puede ser crítico en cerdos durante el período en que se aclimatan al EC en los primeros 8 a 10 días de exposición a temperatura ambiental alta (Ross *et al.*, 2015).

El uso de algunos AA involucrados en las modificaciones moleculares y celulares relacionadas con la aclimatación de cerdos a EC, como es en este caso el estrés oxidativo, puede reducir su disponibilidad para el crecimiento muscular. Esto podría agravar la disminución provocada por la reducción del consumo voluntario de alimento. Uno de estos AA involucrados es la lisina, cuya absorción es de alta importancia en cerdos, debido a que es el primer AA limitante en la mayoría de las dietas (McDonald *et al.*, 2010).

Se cree que la arginina puede ayudar a mitigar los efectos causados por el EC en epitelio intestinal, ya que es un precursor importante para la síntesis de poliaminas estimulantes de la proliferación de células intestinales (Wu *et al.*, 2009).

Debido a que el EC parece que disminuye la integridad intestinal en los cerdos (Pearce *et al.*, 2013), se especula que la reducción de las CS de arginina en cerdos en EC, reportada por Morales *et al.* (2016b), es causada por su mayor uso como un intento de mantener un crecimiento normal e integridad de las vellosidades intestinales. Esto permite sugerir que puede haber demanda de arginina en el intestino de los cerdos EC durante la digestión y los estados de absorción.

2.4. Arginina

La arginina es un AA condicionalmente esencial, utilizado por todas las células, que juega un rol importante en las funciones metabólicas y de regulación de la homeostasis (Flynn *et al.*, 2002).

La síntesis y catabolismo de arginina en tejidos específicos están condicionadas a la presencia de arginina succinato sintasa y arginasa, pero solo hepatocitos periportales y ciertas áreas del cerebro, poseen las enzimas requeridas para el reciclaje de arginina y la síntesis de urea (Meijer *et al.* 1990). El intestino actúa como un usuario de arginina, debido a que posee las enzimas arginasa y ornitina transcarbamilasa (Herzfeld y Raper 1976).

A principios del siglo XX, se creía que arginina era formada en el hígado de los mamíferos; sin embargo, actualmente se considera que existe un balance negativo de arginina por medio del ciclo de la urea hepática, ya que el hígado contiene una alta actividad de arginasa para hidrolizar arginina en urea y ornitina (Wu y Morris, 1998; Wu *et al.*, 2009). Li *et al.* (2008), encontraron en ratones que las concentraciones de arginina en hepatocitos son muy bajas (0.03-0.1 mM) comparado con otros AA (0.5-10 mM).

Existen múltiples rutas metabólicas que utilizan arginina, las cuales son iniciadas por la actividad de arginasa, arginina:glicina amidinotransferasa, óxido nítrico sintasa (ONS) y arginina descarboxilasa, teniendo como productos ornitina, guanidinoacetato, óxido nítrico (ON) y agmatina (Flynn *et al.*, 2002; Morris 2006).

En mamíferos adultos, la síntesis endógena de arginina implica el eje intestinal-renal (Wu y Morris, 1998). Citrulina es sintetizada a partir de glutamina, glutamato y prolina en mitocondrias de los enterocitos, posteriormente es liberada del intestino delgado y llevada primeramente a los riñones para la producción de arginina. La citrulina es rápidamente convertida en arginina en casi todas las células, incluyendo adipocitos, macrófagos células endoteliales, enterocitos, neuronas y miocitos (Wu y Morris 1998).

Dentro de las células, la conversión de citrulina a arginina vía arginina succinato sintasa (ASS) y liasa es la única ruta para la utilización de citrulina (Wu y Morris 1998). Animales con riñones funcionales tienen altos niveles de síntesis de arginina a partir de citrulina endógena y exógena (Wu *et al.*, 2004).

El metabolismo de la arginina en el enterocito permite remover el exceso de arginina, al igual de que el hígado tiene una alta capacidad para el transporte y metabolismo de arginina (De Bandt *et al.*, 1990). El metabolismo de arginina en los intestinos debe ser visto como un medio para limitar el suministro de arginina al hígado, lo que limita la ureagénesis cuando la ingesta de proteína es baja (Cynober, 1994). El metabolismo de la arginina y ornitina en enterocitos puede participar en el soporte de la morfología y función intestinal por la síntesis de poliaminas y ON (Cynober, 1994).

Arginina constituye de 5-7% del total de AA en las dietas y es absorbido principalmente en yeyuno e íleon del intestino delgado (Pahlavani *et al.*, 2017). Cantidades sustanciales de arginina administrada de forma oral, no alcanzan a ingresar en la circulación sistémica en adultos (humanos, ratas y cerdos), debido a que 40% de arginina de las dietas es metabolizada por el intestino delgado (Castillo *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2007). En contraste, existe una pequeña actividad de arginasa (convierte arginina en ornitina y urea) en los enterocitos del intestino delgado, por lo que la mayor parte de lo absorbido de la arginina de la dieta, que no es utilizada localmente para síntesis proteica, puede entrar a la vena porta (Wu *et al.*, 1996).

Debido a que arginina es un precursor nitrogenado para la síntesis de ON con participación de la enzima ONS, regula rutas metabólicas vitales (Jobgen *et al.*, 2006),

por lo que existe un creciente interés en la utilización de arginina más allá de la síntesis de proteínas (Morris, 2007; Rhoads *et al.* 2008; Yao *et al.*, 2008).

2.5. Transporte de arginina en células

Los AA de las proteínas consumidas en el alimento, son absorbidos en el intestino delgado por transportadores de AA (Lin *et al.*, 2015), que se encuentran en la membrana apical de los enterocitos, los cuales tienen diferentes mecanismos de transporte de las moléculas, dependiendo del tipo de transportador.

Estos transportadores en los enterocitos dan paso a su vez a otras moléculas, tales como sodio, potasio, otros AA y agua celular. Una vez localizados los AA en el interior de los enterocitos, son liberados hacia el torrente sanguíneo por los transportadores ubicados en la membrana basolateral, para posteriormente ser distribuidos a diferentes tejidos para realizar sus diferentes funciones, tales como síntesis de proteínas, pero eventualmente también generación de energía y/o ser precursores en la síntesis de otras moléculas (Liao *et al.*, 2009). Algunos de estos AA en forma libre pueden ser reabsorbidos en diferentes órganos (Lin *et al.*, 2015).

El transporte de arginina en las células involucra la participación de transportadores del sistema y^+ , los cuales tienen una alta afinidad, transportador independiente de sodio, así como también transportadores $b^{0,+}$, B^0 , y^+L , dependientes de sodio (Figura 1) (Grillo *et al.*, 2008).

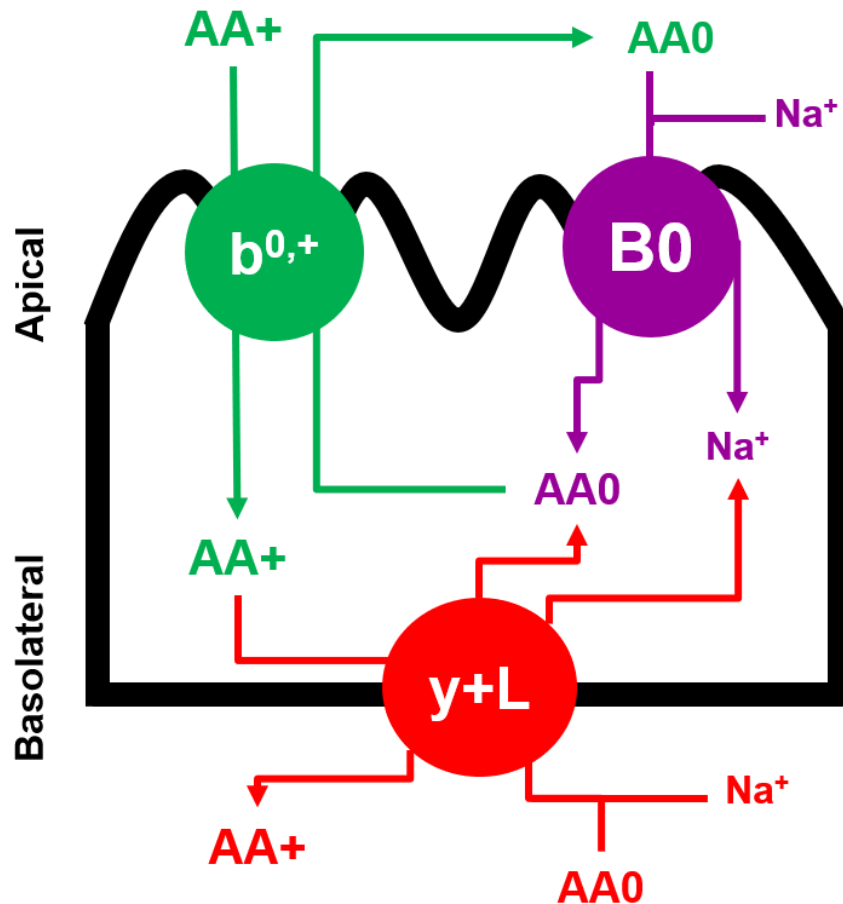


Figura 1. Sistemas de transporte de arginina en enterocitos: $b^{0,+}$ (color verde) y B^0 (color morado) en el área apical. El transportador $y+L$ (color rojo) se observa en el área basolateral. AA^+ , aminoácidos catiónicos; AA^0 , aminoácidos neutros; y Na^+ , sodio (Palacín *et al.*, 2005).

2.6. Sistema $b^{0,+}$ AT/RBAT

El transportador $b^{0,+}$ (SLC7A9) participa en el transporte de cisteína, AA neutros y dibásicos (catiónicos) de alta afinidad e independientes de sodio (Palacín *et al.*, 1999) no obstante este sistema también es dependiente de sodio (Van Winkle *et al.*, 1985). Aunque este sistema tiene una especificidad amplia, prefiere AA benzenoides, leucina, isoleucina, triptófano y fenilalanina, sobre los AA catiónicos (Van Winkle *et al.*, 2005). Este sistema

de transportadores de AA tiene una característica particular que lo hace capaz de formar gradientes con cambios de concentraciones de sodio y potasio (Van Winkle *et al.*, 2005).

La respuesta aguda de los cerdos hacia el EC se encuentra asociada con la expresión reducida de $b^{0,+}$, con una consiguiente reducida concentración de lisina en suero, y, además, con un incremento de la expresión de HSp90 en cerdos (Morales *et al.*, 2014).

2.7. Sistema B0 AT-1

El transportador de AA neutral B0 (SLC6A19) se localiza exclusivamente en la membrana apical del enterocito y tiene preferencia por leucina, isoleucina y valina (Bröer, 2008), que son AA importantes que participan en la regulación de la síntesis de proteínas (Miyasaki y Esser, 2009).

El transportador B0 tiene como función principal mediar la reabsorción epitelial de AA neutros en la membrana apical y se encuentra principalmente en intestino delgado y riñones (Bröer, 2008). Este transportador es dependiente de sodio y cloruro (Seow *et al.*, 2004). Requiere de ACE2 (Enzima convertidor de angiotensina 2) en el intestino y de CLTRN (Colectrina, regulador de transporte de AA) en los riñones para su expresión en la superficie celular y su actividad como transportador (Camargo *et al.*, 2009; Fairweather *et al.*, 2015).

2.8. Sistema y+L-1/4F2HC

El transportador y+L (SLC7A7) es heteromérico y participa en la absorción, independiente de sodio, de AA dibásicos (catiónicos) y en la absorción dependiente de sodio, de algunos AA neutros (Bröer *et al.*, 2000; Fotiadis *et al.*, 2013). Requiere de la coexpresión con SLC3A2 / 4F2HC para mediar la absorción de arginina, leucina y glutamina (Palacín *et al.*, 2005). También actúa como un intercambiador de arginina/glutamina, siguiendo un mecanismo antiporte para el transporte de AA, influyendo en la liberación de arginina a cambio de AA extracelulares (Torrents *et al.*,

1998). Tiene un papel en la síntesis de ON en las células endoteliales a través del transporte de L-arginina y participa en el transporte de L-arginina en monocitos (Arancibia-Garavilla *et al.*, 2003; Rotoli *et al.*, 2004).

El transporte de arginina se encuentra inhibido fuertemente por lisina, leucina, glutamato, histidina y metionina, en presencia de sodio. También es inhibido por la proteína quinasa C (PKC) y forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). La inhibición de la captación de arginina y leucina ocurre cuando SLC3A2 / 4F2HC se trunca el extremo C o cuando existe una mutación en residuos críticos dentro de los 15 AA terminales (Pfeiffer *et al.*, 1999; Rotmann *et al.*, 2007).

2.9. Síntesis de poliaminas

Las poliaminas son moléculas policatiónicas nitrogenadas, esenciales para la proliferación, diferenciación, migración y reparación celular en el epitelio intestinal, y se encuentran involucradas en síntesis de proteínas en funciones biológica como la señalización transduccional y expresión genética (Grillo 1985; Pegg 1986; Wang, 2005; Flynn *et al.*, 2009).

Arginina es considerado como el principal sustrato para la síntesis de poliaminas (Wu *et al.*, 2009), de las cuales putrescina, espermidina y espermina son las principales poliaminas sintetizadas.

La síntesis de poliaminas se encuentra asociada al ciclo de la urea, en donde, a partir de citrulina por medio de la enzima arginina-ASS se produce arginina succinato. Posteriormente la enzima arginina succinato liasa (ASL) produce fumarato y arginina (Wu *et al.*, 2009).

Por acción de la enzima arginasa, arginina produce urea y ornitina. Otra vía productora de ornitina es cuando arginina se convierte en agmatina, por medio de la arginina descarboxilasa, para posteriormente, por acción de la enzima agmatinasa, se produzca ornitina. Posteriormente, ornitina es convertida en putrescina por acción de

ornitina descarboxilasa (ODC), considerada como la enzima limitante en la síntesis de poliaminas (Cynober, 1994; Wu *et al.*, 2009).

La ODC en la mucosa del intestino delgado tiene una actividad basal alta comparado a otros tejidos (Pegg 1986). ODC es asociada células maduras de la punta de las vellosidades y a la proliferación de células en la cripta, sugiriendo participación en diferenciación y proliferación celular (Johnson *et al.* 1989).

Putrescina es convertida en espermidina por la acción de aminopropil-transferasa sobre un grupo amino (espermidina sintasa). Después, una segunda enzima idéntica (espermina sintasa) añade una propilamina a la espermidina, formando espermina. La fuente de los grupos de propilamina es S-adenosil metionina (Cynober, 1994; Wu *et al.*, 2009).

Para la degradación de estas poliaminas, la enzima espermidina / espermina-N¹-acetiltransferasa (SSAT) acetila los grupos de propilamina que fueron agregados, produciendo así una reducción en las cargas de las poliaminas, lo que permite que ocurra una interacción con moléculas de carga negativa como el RNA y DNA (Wang *et al.*, 2004; Pegg *et al.*, 2008). SSAT es una enzima primordial para la regulación en la concentración de las poliaminas (Wang *et al.*, 2004).

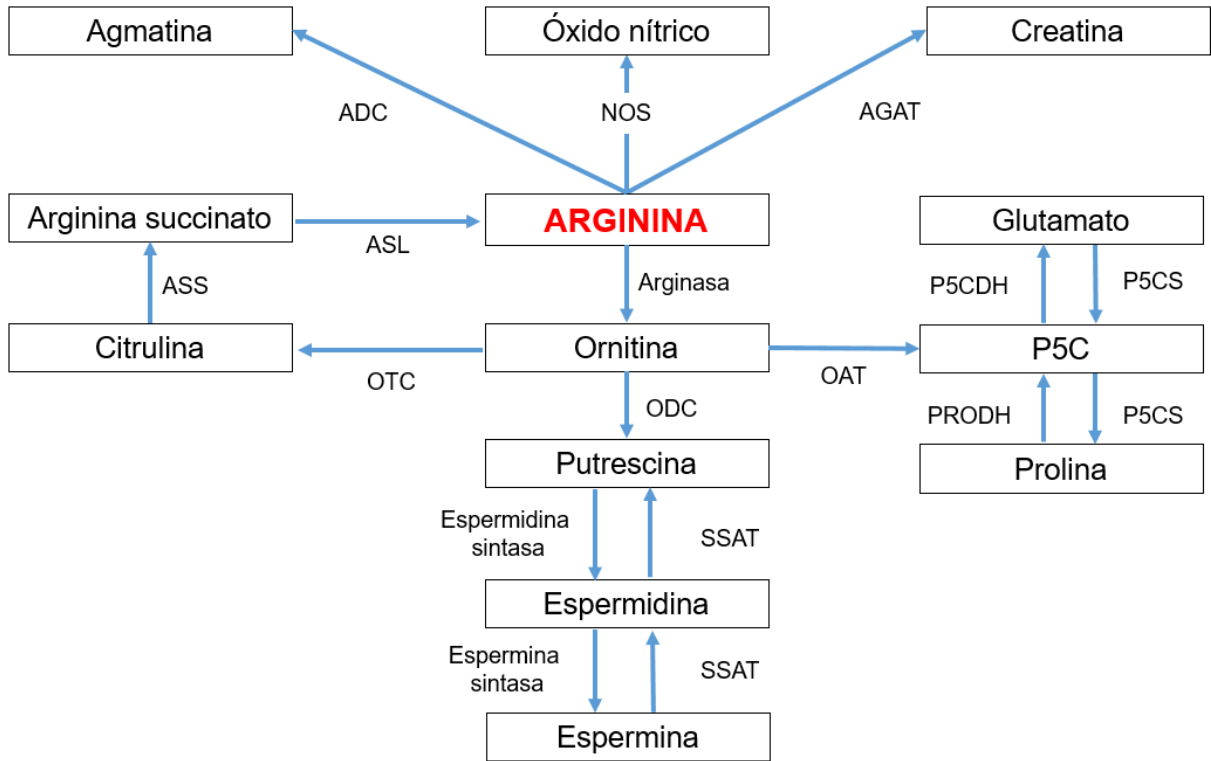


Figura 2. Ruta metabólica para la síntesis de arginina y poliaminas. ADC, arginina descarboxilasa; AGAT, arginina-glicina amidinotransferasa; ASL, arginina succinato liasa; ASS, arginina succinato sintasa; NOS, óxido nítrico sintasa; OAT, ornitina aminotransferasa; ODC, ornitina descarboxilasa; P5CDH, pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa; P5CS, pirrolina-5-carboxilato sintasa; SSAT, espermidina/espermina-N¹-acetiltransferasa (Wu *et al.*, 2009; Lam *et al.*, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de la producción porcina en México es llevada a cabo en condiciones de temperatura ambiental elevada al menos durante el verano, cuando los animales padecen estrés por calor. En consecuencia, es necesario buscar medidas nutricionales para reducir los efectos negativos producidos en los cerdos por esta condición.

Estudios previos demuestran que incluir aminoácidos cristalinos en la dieta de los cerdos puede mejorar algunos de los efectos negativos producidos por el estrés por calor. En este contexto, arginina como aminoácido funcional podría ayudar a mantener la estructura del epitelio intestinal, así como favorecer la absorción de los nutrientes en intestino delgado. Sin embargo, no existen estudios en que se haya suplementado arginina a cerdos expuestos a temperaturas ambientales altas.

3.1. Hipótesis

Las dietas suplementadas con arginina cristalina incrementan la expresión de transportadores de aminoácidos y enzimas asociadas a la síntesis de poliaminas, lo que se asocia con un incremento en la altura de las vellosidades del intestino delgado de cerdos en crecimiento criados en condiciones de estrés por calor.

3.2. Objetivos del trabajo

3.2.1. Objetivo general

- Determinar la contribución de la suplementación de arginina cristalina en los parámetros productivos; disponibilidad de aminoácidos en suero; expresión de transportadores de aminoácidos y enzimas para la síntesis de poliaminas; y características morfológicas del epitelio intestinal de cerdos en crecimiento criados en condiciones de estrés por calor.

3.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la arginina suplementada en el consumo de alimento, ganancia de peso y eficiencia alimenticia de cerdos en etapa de crecimiento criados en condiciones de estrés por calor.
- Analizar el efecto de la arginina suplementada en la concentración de aminoácidos en suero sanguíneo y el rendimiento de cerdos en estrés por calor.
- Evaluar el efecto de la arginina suplementada en las características histológicas de la mucosa en los tres segmentos (duodeno, yeyuno e íleon) del intestino delgado.
- Evaluar el efecto de la arginina suplementada en la expresión relativa de transportadores de aminoácidos y enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas en tres diferentes segmentos del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar del experimento

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología y Metabolismo Animal del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicado en la carretera a Delta s/n en el Ejido Nuevo León, en Mexicali California, México. La situación geográfica del campus corresponde a los 32° 24' latitud Norte y 115° 11' longitud Oeste, con una altitud de 8.2 msnm.

4.2. Instalaciones y distribución

El experimento se realizó durante la época de verano (julio y agosto) de 2018 y tuvo una duración de 21 días. La temperatura ambiental en esa época fluctuó entre 26 y 45°C por día (CONAGUA, 2018). Todos los cerdos fueron alojados individualmente en corrales de piso elevado de 1.44 m², en una nave techada, expuesta a las fluctuaciones naturales de temperatura ambiental. Cada corral estuvo equipado con comederos de un solo orificio y bebedero de chupón, a través de los cuales se suministró el alimento y agua *ad libitum*.

La temperatura ambiente y la humedad relativa, dentro de los cuartos de los animales, fueron registradas a través de un dispositivo Hygro-thermographs (Thermotracker Inc., E.U.A.) configurado para registrar las variables cada hora durante todo el experimento.

4.3. Animales, dietas y procedimiento experimental

Los cerdos utilizados en el presente estudio fueron manejados de acuerdo a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana de cuidado animal (NOM-062-ZOO-1999, 2001). Además, el protocolo del estudio fue aceptado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

Se utilizaron 20 cerdos de cruce terminal (Landrace x Hampshire x Duroc) con un promedio de 2 meses de edad y un peso inicial de 25.4 ± 0.64 kg. Los cerdos fueron distribuidos completamente al azar con 10 réplicas por cada grupo; bloqueados por su peso vivo inicial, sexo y edad. Fueron alojados de forma individual en corrales con una medida de 2.4 m², equipado con un comedero y bebedero de chupón. El alimento y el agua fueron suministrados *ad libitum*.

Uno de los grupos de cerdos fue alimentado con una dieta estándar (Est), mientras que el otro grupo fue alimentado con la misma dieta, pero suplementada con arginina cristalina (Est+Arg) (Cuadro 1). La dieta Est fue formulada y estandarizada para el rango del peso corporal de 25-50 kg. En la dieta, se incluyó trigo y harina de soya, además se suplementó con Lisina, Metionina, Treonina y Triptofano libre para cumplir con los requerimientos de aminoácidos de digestibilidad ileal estandarizada del National Research Council (NRC, 2012).

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales (As Is Basis).

Ingrediente, %	Tratamientos ^a	
	Est	Est+Arg
Trigo	84.43	84.22
Pasta de soya, 48 %	11.50	11.50
L-Lisina • HCl	0.80	0.80
L-Treonina	0.26	0.26
DL-Metionina	0.11	0.11
L-Triptofano	0.02	0.02
L-Leucina	0.16	0.16
L-Arginina·HCl	-	0.20
Carbonato de Ca	1.32	1.32
Fosfato dicálcico	0.65	0.65
Sal iodada	0.35	0.35
Premezcla Vit & Min ^b	0.40	0.40

^a Tratamientos: Est, dieta estándar; Est+Arg, dieta estándar + Arg añadida.

^b Suministró por kg de dieta: Vitamina A, 4,800 IU; Vitamina D3, 800 IU; Vitamina E, 4.8 IU; Vitamina K3, 1.6 mg; Riboflavina, 4 mg; Ácido D-pantoténico, 7.2 mg; Niacina, 16 mg; Vitamina B12, 12.8 mg; Zn, 64 mg; Fe, 64 mg; Cu, 4 mg; Mn, 4 mg; I, 0.36 mg; Se, 0.13 mg.

La dieta con suplementación de arginina (Est+Arg) fue elaborada a partir de la dieta estándar, a la cual se le agregó 20% de arginina cristalina. Este nivel suplementario fue elegido para compensar la reducción del consumo de arginina que se registra, cuando los cerdos con EC reducen su consumo alimentario voluntario entre un 20 y un 40% (Morales *et al.*, 2015). Ambas dietas fueron formuladas para tener los mismos niveles de AA calculados considerando la digestibilidad ileal estandarizada de cada uno de ellos (NRC, 2012), excepto los niveles de arginina en Est+Arg.

Todos los animales fueron pesados y se registró el consumo de alimento para calcular la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia para cada semana durante los 21 días que duró el experimento. El registro de los pesos de animales y alimento se realizó utilizando una báscula digital con capacidad de 200 kg y una división mínima de 500 g (EQM 200, Torrey, México).

Durante el experimento, fue tomada la frecuencia respiratoria cada tercer día de 3 cerdos por tratamiento. La frecuencia respiratoria se tomó a las 0600 h cuando se registra la temperatura más baja, y también en la tarde, a las 1600 h, con la temperatura más alta en el día.

4.4. Toma de muestras

El día 18 de la etapa experimental, a las 1600 h, se tomaron muestras de sangre de los cerdos por la técnica de punción de la vena yugular externa. Para realizar esta toma de muestra, se lazó el animal y se le levantó la cabeza, exponiendo el cuello. Se extrajo la sangre utilizando una aguja hipodérmica desechable de 40 x 1.2 mm, adaptado a un aplicador de aguja, para depositar la sangre en un tubo Vacutainer (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) estéril, sin anticoagulante.

Cinco cerdos de cada tratamiento, ayunados por 12 horas fueron sacrificados al final de la prueba de 21 días. Se utilizó un aturdidor eléctrico (Aturdidor Best & Donovan, Cincinnati, Ohio, USA) con voltaje de 630 V durante 3 segundos, procediendo enseguida a la exsanguinación (Cervantes *et al.*, 2016). Posteriormente, los cerdos fueron eviscerados.

Para el análisis molecular se tomaron muestras de mucosa de duodeno, yeyuno e íleon, las cuales fueron colectadas utilizando portaobjetos para raspar el tejido y almacenarlos en microtubos de 2 ml. Las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido a -192 °C.

Para el análisis de morfología intestinal, se colectaron dos muestras (corte longitudinal y transversal) de aproximadamente 10 cm por segmento del intestino, las

cuales fueron lavadas con solución salina y almacenados en tubos cónicos de 50 ml con formol bufferado al 10% a temperatura ambiente hasta su análisis.

El proceso de colecta de muestras de las vísceras tomó alrededor de 10 minutos. Al final del muestreo, las muestras fueron transportadas al laboratorio de Nutrigenómica del Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC y las muestras en nitrógeno fueron almacenadas a -82 °C para su posterior análisis.

4.5. Análisis de composición química de las dietas

Para el análisis de aminoácidos y de composición química del alimento, se tomaron el día de su preparación, tres muestras representativas de cada dieta y se almacenaron a 4°C en un refrigerador.

Las tres muestras de cada dieta fueron transportadas al Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos de la Facultad de Agronomía de la UANL. De las muestras colectadas de las dietas, fueron realizados los análisis de acuerdo a la metodología de la AOAC (2005) tal como fue descrita por Vásquez (2014):

Humedad (método 930.15, AOAC): el contenido de materia seca de las dietas fue obtenido mediante el método de secado en estufa de aire a 103 °C hasta obtener un peso constante de la muestra.

Cenizas (método 942.05, AOAC): el contenido de cenizas fue obtenido al incinerar la muestra a 550 °C en una mufla Lindberg (Thermo Scientific, Waltham, MA) durante 4 horas, midiendo el residuo después de la incineración.

Grasa (método 942.05, AOAC): el contenido de grasa o extracto etéreo se midió utilizando un extractor de grasa ANKOM XT10 (ANKOM Technology, Macedon, NY) y éter de petróleo, en donde se extraen triglicéridos de la muestra.

Energía bruta: la cantidad de energía en las dietas fue determinada con una bomba calorimétrica (Adiabatic Calorimeter 1241, Parr Instrument Company, Moline, IL, USA), la

cual cuantifica el calor después de la combustión de la muestra al someterse a oxidación. El contenido de energía bruta fue calculado de acuerdo a (Urriola *et al.*, 2014).

Fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y lignina: el contenido de fibra detergente neutro y fibra detergente ácido fue determinado de acuerdo a la metodología de Van Soest *et al.* (1991), empleando un analizador de fibra ANKOM²⁰⁰⁰ (Ankom Technology, Macedon, NY) con una tecnología de bolsas filtrantes. El contenido de lignina ácido detergente fue realizado de acuerdo a la metodología de Ramírez (2007).

Proteína cruda (metodología 2001.11, AOAC): la proteína cruda fue determinada por el método Kjeldahl, el cual mide el contenido de nitrógeno total en la muestra. La muestra pasa por un proceso de digestión a 420°C durante aproximadamente 2 horas con ácido sulfúrico, seguido de una destilación con hidróxido de sodio, para posteriormente realizar una titulación con ácido bórico y una solución indicadora Rojo Metilo-Verde bromocresol. El contenido de proteína cruda fue calculado de acuerdo a la metodología de la AOAC (2005).

4.6. Análisis de aminoácidos en suero sanguíneo y dietas

Las muestras de sangre de todos los cerdos del experimento fueron trasladadas al Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Ciencias Agrícolas y fueron centrifugadas (Megafuge 1.0 Centrifuge, Baxter Scientific Heraeus Instruments, Thermo Scientific, CA, USA) a 3000 x g, a 4°C por 10 minutos para separar el suero del coágulo con pipetas de transferencia desechables de 2 ml. Se colectó 1 ml de suero y se almacenó en criotubos de 2 ml a -20 °C. Los tubos con suero colectado se enviaron a un laboratorio externo para liofilizar (Llames y Fontaine, 1994).

Las muestras liofilizadas de suero y una alícuota de las muestras de las dietas fueron enviadas a un laboratorio en la Universidad de Missouri, USA, para determinar el contenido de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico (HPLC por sus siglas en inglés), método 98.30 (AOAC, 2005).

4.7. Análisis de morfología intestinal

Las muestras de tejido intestinal almacenadas en formol bufferado en PBS al 10% fueron utilizados para análisis histológico mediante el método de parafina estándar, y una tinción de hematoxilina y eosina (Luna, 1968; Villalobos, 2018), el cual fue realizado en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario UANL, en Monterrey, México.

Previo al envío, se realizaron dos cortes de las muestras transversales y un corte longitudinal de la muestra de cada segmento del animal. Los tres cortes fueron puestos en una cápsula histológica de inclusión para biopsias y tejidos, identificados por animal y cerrados herméticamente, después fueron colocados en un bote de plástico con tapa relleno de formol bufferado para su traslado. El proceso histológico fue llevado a cabo de la siguiente manera:

Las muestras en las cápsulas histológicas fueron deshidratadas utilizando baños de alcohol etílico a diferentes concentraciones usando un procesador automático con sistema al vacío (Cuadro 2).

Cuadro 2. Protocolo de deshidratación de las muestras de tejido intestinal.

Paso	Solución	Tiempo (h)
1	Alcohol etílico 70%	12
2	Alcohol etílico 70%	12
3	Alcohol etílico 80%	1
4	Alcohol etílico 90%	1
5	Alcohol etílico 100%	1
6	Alcohol etílico 100%	1

Después de la deshidratación de las muestras del tejido intestinal, se llevó a cabo una aclaración con xilol, procediendo de acuerdo al protocolo señalado en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Protocolo de aclaración con xilol de las muestras de tejido intestinal.

Paso	Solución	Tiempo
1	Alcohol – xilol (50% - 50%)	1
2	Xilol	1
3	Xilol	1

Posterior a la aclaración con xilol, se sumergieron las cápsulas en parafina líquida para embeber las muestras de tejido y se dejaron enfriar. Las cápsulas con las muestras embebidas en parafina fueron colocadas en un micrótopo para hacer cortes de aproximadamente 4 μm de grosor. Estos cortes se suspendieron por flotación en un baño María con agua a 40-45 °C y luego fueron colocados con cuidado en un portaobjetos.

Posteriormente, los portaobjetos con los cortes fueron llevados a un proceso de desparafinación con xilol e hidratación con una serie de soluciones de etanol en diferentes concentraciones, para finalizar con un proceso de tinción con hematoxilina y eosina (Luna, 1968). El protocolo se detalla en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Protocolo de tinción (hematoxilina y eosina) de los tejidos intestinales.

Paso	Solución	Tiempo (min)
1	Alcohol – xilol	5
2	Alcohol 100%	2
3	Alcohol 96%	2
4	Agua destilada	2
5	Hematoxilina de Harris	1
6	Agua de grifo	1
7	Agua destilada	2 inmersiones
8	Alcohol ácido	2 inmersiones
9	Agua destilada	2
10	Agua amoniacal	1 inmersión rápida
11	Agua destilada	1
12	Eosina	1
13	Alcohol 96%	2 inmersiones
14	Alcohol 96%	2 inmersiones
15	Alcohol 100%	2 inmersiones
16	Etanol – xilol	2
17	Xilol	2
18	Xilol	2

Los cortes teñidos en el portaobjetos fueron sellados con una resina sintética y fueron cubiertos con un cubreobjetos; y se dejó reposar para su posterior proceso que fue la visualización en el microscopio.

La observación de los cortes teñidos fue llevada a cabo con un microscopio óptico de la marca Primo Star Zeis (HBO, México) en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

Se llevó a cabo la toma de fotografías con una cámara PowerShot G10 de la marca Canon montada en el microscopio de tal forma que en la imagen se pudieran visualizar las vellosidades y criptas del intestino delgado con un aumento de 4X. Estas imágenes fueron almacenadas en formato JPEG en una memoria SD de 32 GB y descargadas a una computadora para su posterior análisis.

4.8. Medición de altura y ancho de vellosidades y profundidad de la cripta

Las imágenes de cada segmento del intestino delgado de los animales descargadas a la computadora fueron utilizadas para medir la altura y ancho de las vellosidades y la profundidad y ancho de las criptas. Para ello, fue utilizado el software Image J2 (Curtis *et al.*, 2017), el cual permitió utilizar una escala para calcular las mediciones de pixeles a mm, tal como fue descrito por Vásquez (2018).

El primer paso consistió en abrir la imagen con las vellosidades a medir, utilizando el comando Ctrl + O para seleccionar la imagen y descargarla en el programa. El segundo paso fue establecer la escala, por medio de seleccionar la longitud de una vellosidad promedio (Figura 3) utilizando la opción de “Línea” en la barra de herramientas. Para ello, se abrió la opción de “Establecer escala” que se encuentra en el apartado de “Analizar”, de la barra de herramientas, registrando la distancia conocida (8601.51 pixeles/mm) y la unidad de la longitud (mm), activando la opción de “Global” (Vásquez, 2018).

Establecida la escala, se procedió a realizar las mediciones de las longitudes seleccionadas usando el comando de Ctrl + M, abriendo una lista con las mediciones realizadas, las cuales fueron exportadas a un archivo de Excel (Microsoft Office, 2013) para su posterior análisis estadístico.

Se midieron al menos 10 vellosidades íntegras y uniformes y las correspondientes dos criptas de cada una de las vellosidades, por cada muestra de segmento. Es decir, se midieron un mínimo de 20 vellosidades y 40 criptas por animal.

Además, se calculó la relación vellosidad:cripta (V:C) para determinar la arquitectura de la vellosidad.

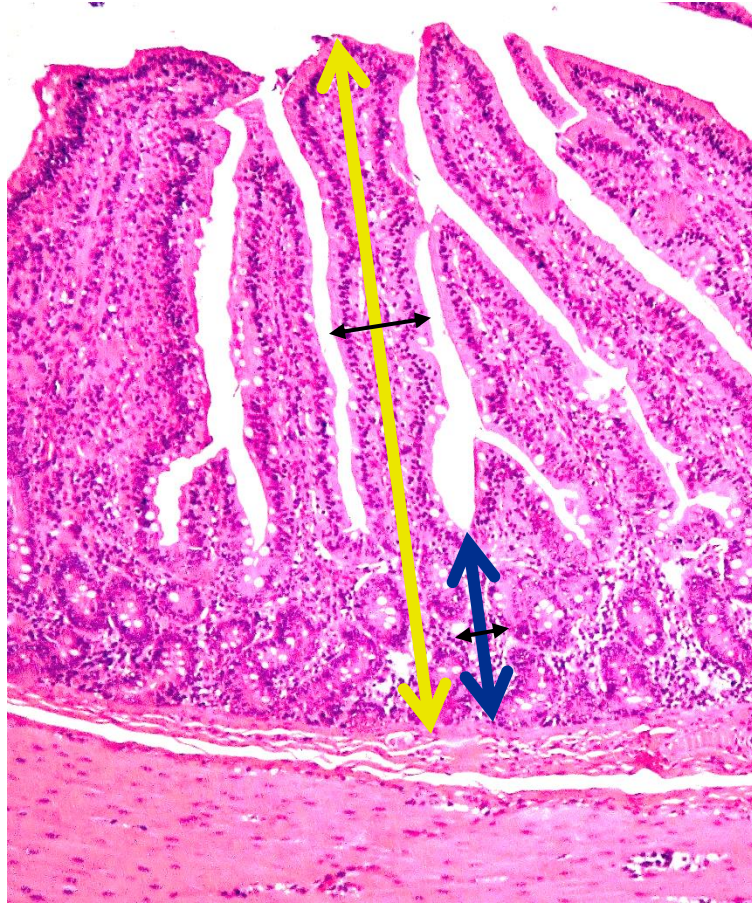


Figura 3. Ejemplo de medición de la longitud (flecha amarilla) y profundidad de cripta (flecha azul), de una vellosidad seleccionada, utilizando el programa Image J de un corte histológico de intestino delgado. Las flechas negras indican ancho de la vellosidad y cripta.

4.9. Extracción total de RNA y purificación

El análisis molecular fue llevado a cabo en el Laboratorio de Nutrigenómica del Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA) de la UABC. Las muestras colectadas de la mucosa, aún congeladas (-80 °C), fueron colocadas en un mortero previamente congelado con nitrógeno líquido adicionado, con la finalidad de pulverizar la muestra. Para la extracción de RNA fue utilizado un kit comercial (Direct-zol RNA Microprep Kit R2052, Zymo Research, Irvine, CA, USA).

Aproximadamente 50 mg del tejido pulverizado fueron colocados en un microtubo con 530 μ l de Trizol Reagent (Invitrogen, Corp.). La muestra fue homogenizada y se dejó incubando por un minuto y posteriormente se centrifugó (MICRO21R, Thermo Scientific, CA, USA) a 12,000 x g por 2 minutos. El sobrenadante fue recuperado en otro microtubo, tratando de no tocar la pastilla formada en el fondo. Se añadieron 500 μ l de etanol al 100% y se agitó. El líquido fue transferido a una columna con un microtubo de colección y fue centrifugado a 10,000 x g por un minuto.

Posteriormente, la columna se colocó en un microtubo nuevo de colección y se añadieron 400 μ l de RNA Prewash (Zymo Research, CA, USA). Se centrifugó a 10,000 x g por un minuto, se desechó el sobrenadante y se repitió este paso. Una vez repetido el paso se agregaron a la columna 700 μ l de RNA Wash Buffer (Zymo Research, CA, USA) y se centrifugó a 10,000 x g por 2 minutos.

La columna fue transferida a un microtubo libre de RNasa. Se añadieron 30 μ l de DNase/RNase-Free Water (Zymo Research, CA, USA) a la columna y se centrifugó a 10,000 x g por un minuto. La columna fue desechada y el RNA purificado fue almacenado a -82°C hasta el siguiente procedimiento.

La concentración del RNA total se determinó con un espectrofotómetro (Helios β , Thermo Electron Co.) a 260 y 280 nm, definiendo pureza del RNA cuando la relación de A260/A280, estuviese en un rango de 1.8 a 2.0 (Sambrook y Russell, 2001). La integridad del RNA total fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%.

4.10. Transcripción reversa

Aproximadamente 3 μ g del RNA total se trataron con 0.75 μ l de DNasa I (1 U/ μ l; Invitrogen) y 6 μ l de buffer de transcripción reversa al 5X en 20.25 μ l de reacción completada con agua tratada DEPC. La reacción fue llevada a cabo durante 15 minutos a temperatura ambiente y otros 5 minutos a 70°C hasta parar la reacción.

La transcripción reversa se inició con una solución de DNasa tratada con muestras de RNA, añadiendo 2 μ l de primers al azar (150 ng/ μ l, Invitrogen) y 1 μ l de una solución

de dNTP's (10 μ M cada uno). La reacción fue incubada por 5 minutos a temperatura ambiente y se dejó reposar en hielo por un minuto para añadir a la reacción 3 μ l de agua DEPC, 1 μ l de inhibidor de ribonucleasa (40 U/ μ l, RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Fisher Scientific), y 2 μ l del buffer de transcripción reversa al 5X. La reacción fue incubada a 42°C durante 2 minutos para estabilizarla antes de añadirle 1 μ l de la enzima de transcriptasa reversa (200 U/ μ l; RevertAid H Minus RT, Thermo Fisher Scientific).

La reacción fue incubada a 42°C durante 50 minutos. Posteriormente, la mezcla se incubó a 70°C por 15 minutos y se dejó reposar en hielo para detener la reacción. La reacción fue almacenada a -20°C para su posterior uso. Las muestras de cDNA fueron cuantificadas con el espectrofotómetro (Helios β , Thermo Electron Co.) y diluyeron en una concentración final de 50 ng/ μ l.

4.11. PCR cuantitativo (qPCR)

Oligonucleótidos específicos para cada transportador de aminoácido y de enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas, fueron diseñados de acuerdo a las secuencias publicadas en el Genbank. El gen de proteína ribosomal 4 (RPL4) fue utilizado como gen de referencia para normalizar las variaciones en el mRNA (Cuadro 5).

La expresión relativa de los transportadores de aminoácidos y enzimas en duodeno, yeyuno e íleon, fueron determinados por un ensayo de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR). Para la amplificación y cuantificación de los productos de qPCR se utilizó el kit comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas Corp., Glen Burnie, MD, USA), y las reacciones se realizaron en un termociclador CFX96 Touch, versión 3.0 (Bio-Rad, Herefordshire, England).

El termociclador contenía un plato con capacidad de 96 muestras, en donde en cada tubo se agregó un volumen final de 25 μ l, conformado por 8.5 μ l de agua libre de RNasa y DNasa, 12.5 μ l de SYBR Green Mix, 3 μ l de oligo Mix (5 μ M de cada oligonucleótido) y 1 μ l de cDNA (50 ng/ μ l), la cantidad faltante de los blancos fue completada con agua libre de RNasa y DNasa.

Las muestras fueron analizadas por duplicado. La primera columna del plato fue exclusiva para tres muestras duplicadas de los siguientes blancos:

- 1) reacción de PCR sin DNA
- 2) reacción de PCR con DNA, pero sin oligo Mix
- 3) reacción de PCR con DNA, pero sin SYBR Green Mix.

Las condiciones del PCR usadas para la amplificación y cuantificación fueron:

- 1) Etapa de desnaturalización fue de 95 °C por 5 minutos
- 2) Etapa de amplificación con 40 ciclos empezando por una desnaturalización de 95°C por 15 segundos, un alineamiento a 56°C por 15 segundos y una elongación a 72°C por 30 segundos
- 3) Un programa de curva de desnaturalización (65°C – 95°C).

Se midió la fluorescencia al final de cada ciclo de la etapa de amplificación y cada 0.5 °C durante el programa de la curva de desnaturalización.

La expresión relativa de los mRNA de transportadores de aminoácidos y de enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas fue calculada haciendo una normalización con la expresión relativa de RPL4, considerando la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ propuesta por Livak y Schmittgen, (2001). Los resultados obtenidos se emplearon para hacer una comparación del tratamiento Est+Arg con el tratamiento Est.

Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados para análisis de PCR cuantitativo de mRNA derivados de transportadores de aminoácidos ($b^{0,+}$, B0 y y^{+L}), enzimas asociadas al metabolismo de arginina y poliaminas (ASS, ODC y SSAT) y RPL4.

mRNA	Oligo nucleótidos	Lugar en el templado (pb)	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicon (pb)
B0 , Transportador de aminoácidos neutros SLC6A19 (GenBank: DQ231579.1)				
	Sentido	88-107	GGTCTACTCCATCATCGGCT	195
	Antisentido	282-263	ATGTCGCAGGTCTGGA ACTT	
$b^{0,+}$, Transportador de aminoácidos SLC7A9 (GenBank: NM_001110171.1)				
	Sentido	731-750	CAAACTGTCTGTGGGAGCC	385
	Antisentido	1115-1096	GAGAGCACCTTGAGCATGTG	
y^{+L} , Transportador de aminoácidos SLC7A7 (GenBank: NM001110421.1)				
	Sentido	273-292	GTGGGGAACATGATTGGCTC	244
	Antisentido	516-497	CGATGATGAGGAGGGAGGTC	
ASS , Arginina succinato sintasa (GenBank: AY550053.1)				
	Sentido	580-599	GGAGCTGGGCCCCCTCACTT	187
	Antisentido	766-747	TACGGCAGCCACCCCCTACC	
ODC , Ornitina descarboxilasa (GenBank: NM_214358.1)				
	Sentido	499-518	GTCTGTGCCTCAGTGTCAA	340
	Antisentido	838-819	CTGGCTCCGCTATGATTCTC	
SSAT , Espermina/espermidina acetiltransferasa (GenBank: NM_214358.1)				
	Sentido	214-233	AGTGCCAAGGAGCATCTAA	338
	Antisentido	551-532	CCTCTGCTGCCATTTTTAGC	
RPL4 , Proteína Ribosomal L4 (GenBank: DQ84576.1)				
	Sentido	362-381	GCGTAAAGCTGCTACCCTCA	221
	Antisentido	582-563	GAATGGTGTTCGGCGCATT	

4.12. Análisis estadístico

Los análisis de varianza de los datos obtenidos fueron realizados utilizando el Modelo Lineal General del programa estadístico de SAS 8.2 (Sas Institute Inc., Cary, NC, USA). Las diferencias de medias fueron evaluadas a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Temperatura ambiental y humedad relativa

La temperatura máxima y mínima registradas dentro de la sala en donde se alojaron los animales durante los 21 días del periodo de experimentación fueron de 39.6 °C y 28.1 °C, respectivamente, con una temperatura promedio de 32.8 °C y un rango de humedad relativa registrada desde 36.6% hasta 99.3% con un promedio de 69.5%.

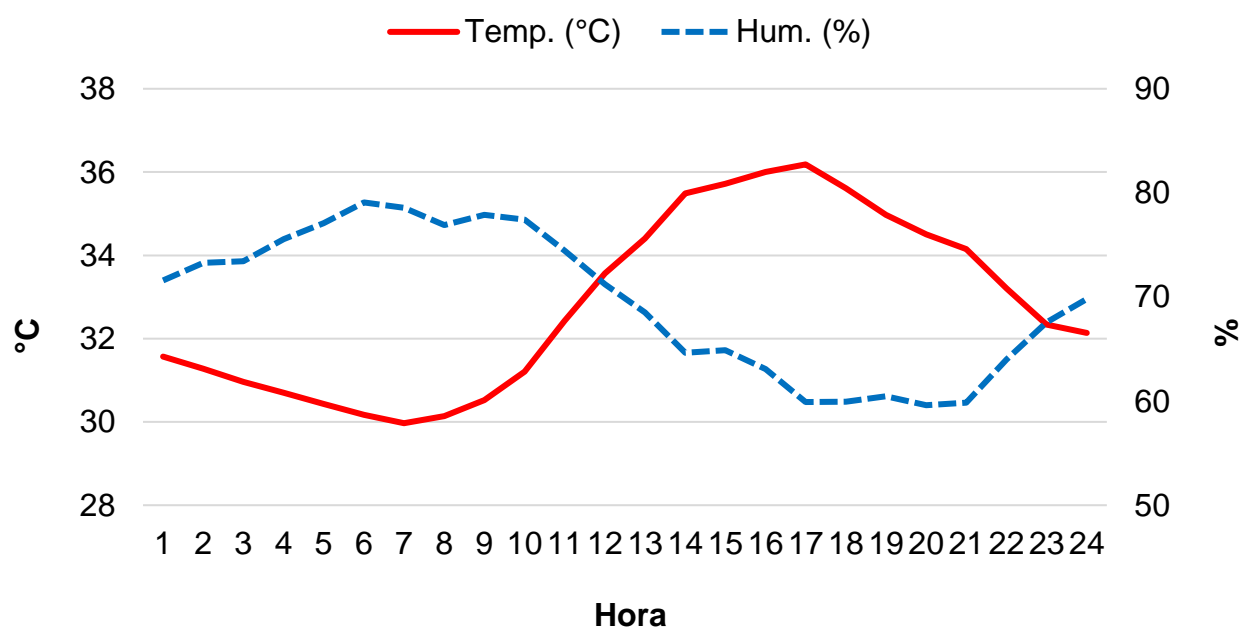


Figura 4. Variación de la temperatura y humedad durante las 24 h del día. Los valores mostrados para cada hora corresponden a las medias de los datos obtenidos de los 21 días del experimento.

Las temperaturas más bajas durante el día se presentaron entre las 0300 h y 0800 h con una temperatura promedio de 30 °C. En ese período se registró una humedad relativa entre 75 y 78%, siendo éstos los valores más altos del día.

Entre las 1300 h y 1800 h se registraron las temperaturas más altas del día, con valores entre los 35 y 36.4 °C. Durante ese período la humedad relativa registrada fue entre 58 y 65% (Figura 4).

De acuerdo a Huynh *et al.* (2005), la temperatura de confort del cerdo tiene un rango de 18 °C a 22 °C; sin embargo, en el presente trabajo los animales fueron alojados bajo condiciones ambientales de Mexicali, Baja California, que es una zona con temperaturas extremas (28 - 40 °C) y porcentajes variados de humedad (37 – 99%) durante el verano (CONAGUA, 2018), lo que provoca una exposición constante al EC (Cervantes *et al.*, 2016).

5.2. Índice de temperatura y humedad

El índice de temperatura y humedad (ITH) promedio por hora para los 21 días de experimento osciló en un rango de entre 88 y 156 (promedio diario de 110.5). El valor más alto se registró a las 1400 h, y el valor más bajo de ITH a las 0700 h (Figura 5).

El ITH es un número calculado (Steadman, 1979) que se utiliza para indicar la sensación térmica en grados Fahrenheit causada por los efectos combinados de la temperatura ambiental y de la humedad relativa en el ambiente, en esta escala 80 es el límite máximo de la zona de confort en un cerdo en crecimiento (Xin y Harmon, 1998).

La temperatura ambiental y humedad relativa registradas durante el experimento, así como los resultados del ITH, indican que los cerdos fueron expuestos a EC durante toda la etapa experimental (Xin y Harmon, 1998). Asimismo, el promedio del ITH tuvo un valor muy elevado (110.5), lo cual indica una exposición a EC, debido a que sobrepasa el límite de la sensación de confort para los cerdos (Cervantes *et al.*, 2016).

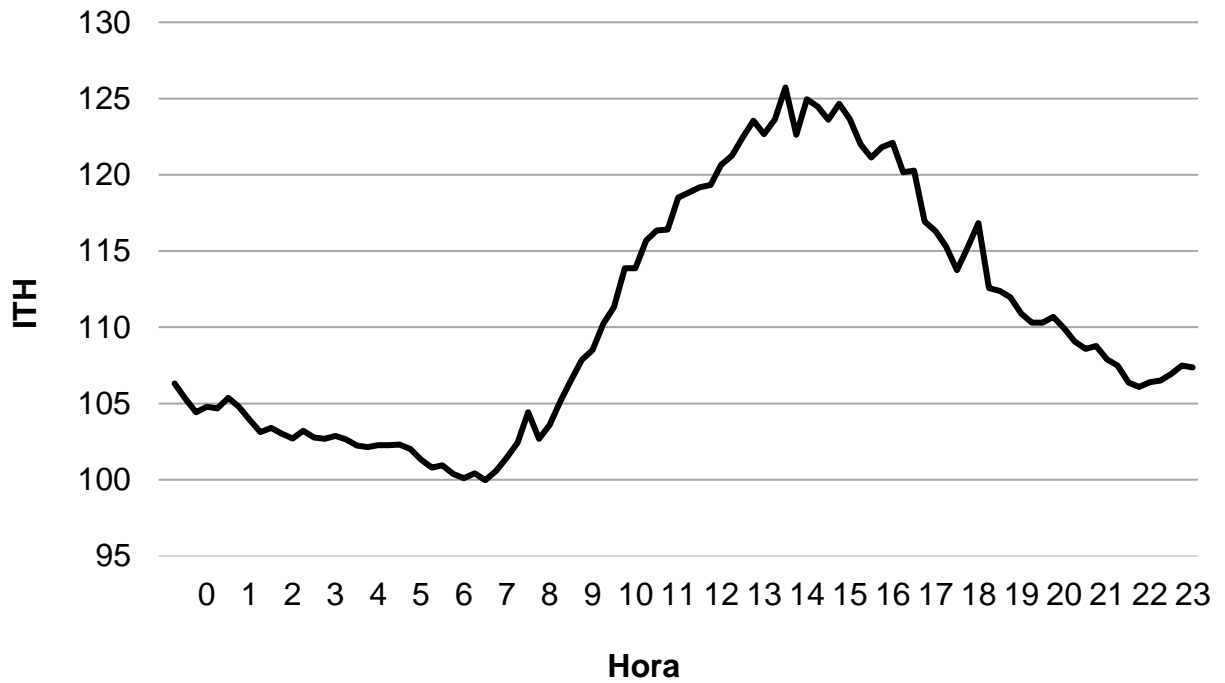


Figura 5. Variación del índice de temperatura y humedad durante las 24 h del día. Los valores mostrados para cada hora corresponden a las medias de los datos obtenidos de los 21 días del experimento.

5.3. Composición química del alimento

La composición química fue similar en ambas dietas para las variables analizadas (Cuadro 6). Únicamente, de acuerdo con el diseño, el contenido de arginina en la dieta Est+Arg fue 13% mayor en comparación con la dieta Est.

Cuadro 6. Composición química en las dietas (Base MS).

Variable, %	Tratamientos		EEM	P
	Est	Est+Arg		
Materia seca	92.48	92.44	0.057	0.633
Cenizas	5.19	5.14	0.358	0.936
Grasa	4.42	4.54	0.126	0.543
Energía bruta, kcal/kg	4608	4561	86.660	0.717
NDF	35.38	30.87	1.286	0.068
ADF	4.56	4.76	0.177	0.465
Lignina	1.04	1.59	0.097	0.016
Proteína cruda	17.9	18.0	0.262	0.818
Lisina	1.24	1.39		
Treonina	0.71	0.75		
Metionina	0.31	0.29		
Triptófano	0.24	0.24		
Arginina	0.89	1.01		

5.4. Parámetros productivos

Los cerdos de ambos tratamientos iniciaron con un peso vivo similar. A todos los cerdos se les ofreció la misma cantidad de alimento y a la misma hora. No hubo diferencias en la ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia. La arginina cristalina suplementada en la dieta no tuvo efecto significativo en los parámetros productivos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Peso vivo, ganancia de peso, consumo de alimento y eficiencia alimenticia de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.

Variable	Tratamientos		EEM	P
	Est	Est+Arg		
Peso vivo inicial, kg	25.7	25.0	1.205	0.829
Ganancia de peso, kg/d	0.506	0.506	0.053	0.815
Consumo de alimento, kg/d	1.298	1.251	0.032	0.875
Eficiencia alimenticia	0.389	0.405	0.053	0.716

Uno de los principales efectos causados por el EC es una pronunciada disminución del consumo de alimento que conlleva a un bajo rendimiento productivo en el crecimiento de los cerdos. En el presente trabajo, ambos tratamientos se encontraron bajo condiciones de EC y mostraron valores similares de ganancia de peso, consumo de alimento y eficiencia alimenticia, a pesar de la suplementación con arginina en el grupo Est+Arg.

Estos resultados son similares a los de Yang *et al.* (2016), quienes no obtuvieron diferencias en el consumo de alimento y la eficiencia alimenticia en lechones alimentados con 0% (dieta control), 4% u 8% de L-arginina en la dieta. Sin embargo, sus resultados de ganancia de peso fueron diferentes a los del presente estudio, debido a que Yang *et al.* (2015) reportaron que en los primeros 21 días, los lechones con 4% y 8% de L-arginina en la dieta tuvieron una mayor ($P=0.004$) ganancia de peso a comparación de los cerdos sin añadir L-arginina en la dieta. Ellos respaldan los datos en la idea de que la disponibilidad de arginina puede limitar la velocidad de crecimiento en lechones y que L-arginina en la dieta tiene un efecto promotor del crecimiento, siempre y cuando sea mayor a 4.8 g/kg con un límite de 8 g/kg en lechones, además de que se ha demostrado que la suplementación con arginina es esencial y mejora la eficiencia de absorción y utilización de nutrientes en cerdos jóvenes (Huang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016).

También los resultados por Pérez y Trottier (2001) fueron diferentes a los del presente estudio, ya que las cerdas lactantes bajo condiciones de EC que ellos alimentaron con dietas suplementadas con 1.34% y 1.74% de L-arginina, tuvieron un consumo menor en comparación con la dieta testigo. En sus resultados de ganancia de peso, las cerdas alimentadas con 1.34% y 1.74% de L-arginina tuvieron una mayor ganancia de peso en comparación con las cerdas alimentadas con la dieta testigo. De acuerdo con Pérez y Trottier (2001) las cerdas lactantes requieren un mayor consumo de arginina, y es probable que arginina a concentraciones superiores del requerimiento mejora la utilización de nutrientes, particularmente en temperaturas ambientales altas, involucrando hormonas metabólicas clave, como insulina, prolactina, glucagón y hormona de crecimiento.

Resultados de Hu *et al.* (2015) mostraron diferencias de ganancia de peso en cerdos en crecimiento bajo condiciones de TN, alimentados con 0%, 1%, 1.5% y 2% de L-arginina, en las que los cerdos alimentados con 1.5% y 2% de L-arginina mostraron una mayor ganancia de peso.

Los cerdos del presente estudio estuvieron bajo condiciones de EC, alimentados con una dieta estándar y con una dieta suplementada con 1% de L-arginina (Base MS). La mayoría de los estudios en donde se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los cerdos tuvieron una suplementación de más del 1%.

Además, es importante recalcar que siendo la disminución del consumo de alimento el principal efecto del EC, el nivel de L-arginina en la dieta en el presente experimento fue diseñado para tratar de compensar un 25% de reducción del consumo de alimento (Morales *et al.*, 2014). Probablemente se podría evaluar una mayor dosis de L-arginina en la dieta para observar diferencias como en los estudios anteriormente mencionados.

5.5. Frecuencia respiratoria

La frecuencia respiratoria registrada a las 0700 h fue tendencialmente ($P= 0.078$) mayor en los cerdos alimentados con la dieta Est que para los alimentados con Est+Arg, con valores de 69 y 54 respiraciones por minuto, respectivamente (Figura 6).

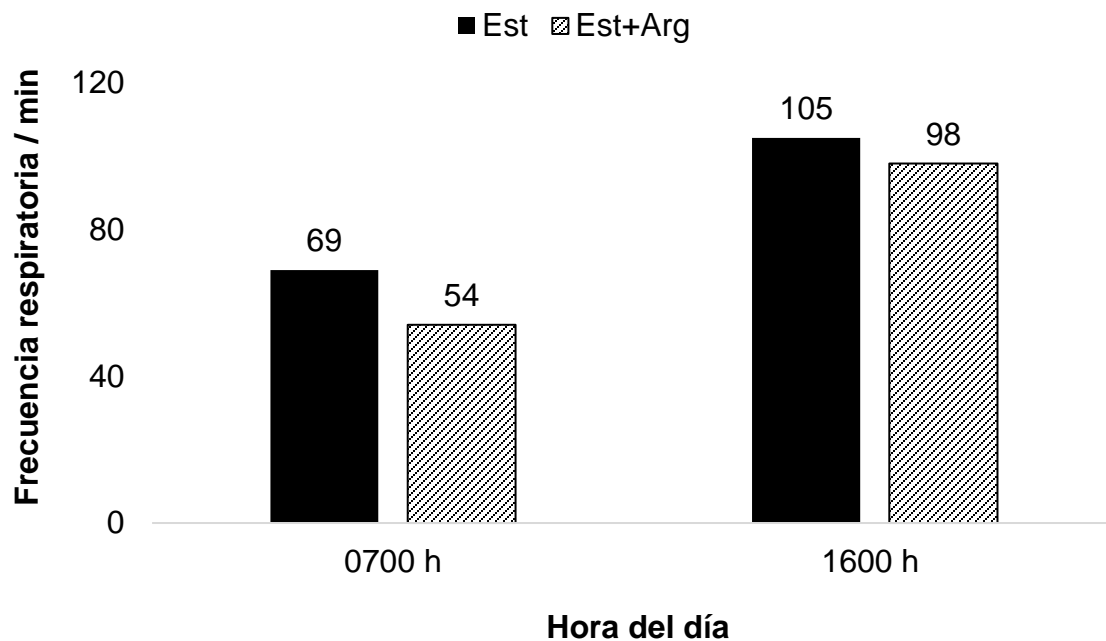


Figura 6. Frecuencia respiratoria (eventos/min) medida a 0700 h y 1600 h ($P<0.1$) de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.

A las 1600 h no se encontraron diferencias ($P=0.515$) en la frecuencia respiratoria, debidas a los tratamientos, habiéndose registrado 105 y 98 respiraciones por minuto. Estos resultados coinciden con los reportados por Pérez y Trottier (2001) y Cervantes *et al.* (2016), indicando que los cerdos tienen un aumento en la frecuencia respiratoria conforme la temperatura va aumentando durante el día cuando son expuestos

diariamente a condiciones alternas de EC y semi-confort, siendo esto una forma de adaptación.

En el estudio de Pérez y Trottier (2001) también se analizó el efecto de diferentes concentraciones de suplementar con arginina (0.96%, 1.34% y 1.74%) la dieta de animales bajo condiciones de EC, sin haber obtenido diferencias significativas ($P=0.72$) entre los tratamientos.

Liu *et al.* (2018), alimentaron cerdas lactantes bajo condiciones de EC durante 26 días con una dieta a base de trigo y cebada, teniendo dos tratamientos (dieta control y dieta L-citrulina). Ellos reportaron una reducida frecuencia respiratoria en cerdas lactantes alimentadas con una suplementación de 1% de L-citrulina, un AA precursor de arginina, relacionado con la síntesis de ON (Liu *et al.*, 2018).

5.6. Composición de aminoácidos en suero sanguíneo

La concentración de AA en el suero sanguíneo de los cerdos es utilizada para tener una perspectiva de en qué medida los AA se encuentran circulando en el torrente sanguíneo y son disponibles para el organismo. En las muestras de suero sanguíneo de los cerdos del experimento se observó incremento en la CS de algunos AA esenciales, este incremento fue altamente significativo en el caso de arginina ($P < 0.01$), y significativo ($P < 0.05$; Cuadro 8) en el caso de histidina, metionina, treonina y triptófano; en el caso de valina se encontró una tendencia a incrementar su concentración ($P < 0.10$).

Cuadro 8. Composición de aminoácidos esenciales ($\mu\text{g/ml}$) en suero analizados en los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.

Variable, $\mu\text{g/ml}$	Tratamientos		EEM	P
	Est	Est+Arg		
Arginina	27.4	38.3	1.738	0.001
Fenilalanina	15.2	18.0	1.224	0.127
Histidina	9.6	12.9	1.004	0.044
Isoleucina	14.3	15.7	1.687	0.574
Leucina	23.3	28.0	2.465	0.212
Lisina	31.7	39.7	4.150	0.200
Metionina	5.1	8.2	0.935	0.042
Treonina	20.8	31.5	3.274	0.043
Triptofano	8.5	11.3	0.766	0.026
Valina	22.5	33.3	4.013	0.084

En el caso de los AA no esenciales de los sueros analizados, únicamente se observó una tendencia ($P = 0.062$) a reducir la concentración de alanina en los cerdos

alimentados con el tratamiento Est+Arg (Cuadro 9). La CS del resto de los AA no esenciales permaneció sin cambio.

Cuadro 9. Composición de aminoácidos no esenciales ($\mu\text{g/ml}$) en suero analizados en los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.

Variable, $\mu\text{g/ml}$	Tratamientos		EEM	P
	Est	Est+Arg		
Alanina	85.8	53.2	10.977	0.062
Ácido aspártico	3.0	2.2	0.415	0.205
Ácido glutámico	29.7	17.3	5.961	0.170
Asparagina	8.9	9.3	0.662	0.651
Cisteína	0.3	0.4	0.126	0.696
Glicina	80.9	73.3	7.413	0.486
Glutamina	77.3	75.3	5.460	0.805
Prolina	58.0	57.0	5.882	0.908
Serina	28.5	21.1	3.401	0.159
Tirosina	13.7	16.4	1.709	0.303

Cambios en la CS de AA en cerdos bajo condiciones de EC han sido reportados por Morales *et al.* (2014b), quienes también reportaron que el EC modifica la abundancia de transportadores de AA, como $b^{0,+}$ y Cat-1, lo cual tiene un gran impacto en la absorción de aminoácidos provenientes del alimento consumido. Al estar los sistemas de transporte de AA afectados, la cantidad de AA transportados al torrente sanguíneo disminuye y por lo tanto se ve la CS de los AA reducida. Además, ha sido demostrado que el EC reduce en un 30% la CS de arginina, lisina y treonina (Morales *et al.*, 2016b), lo cual se le atribuye a un mayor requerimiento de ciertos AA ante un estrés severo.

En el presente trabajo, la CS de arginina aumentó un 40% para los cerdos suplementados con arginina en comparación con aquellos que recibieron la dieta Est. Arginina es uno de los principales precursores en la síntesis de NO, principal vasodilatador que hipotéticamente podría ayudar a disipar el calor aumentando el flujo sanguíneo permitiendo una disipación del calor por el EC (Wu *et al.*, 2009). La síntesis de poliaminas es otra función que tiene la arginina como precursor (Flynn *et al.*, 2009).

La CS de metionina mostró un aumento de 61% al suplementar con arginina. Metionina al igual que arginina tiene participación en procesos antioxidantes, al ser donador de grupos metilo para la formación de creatina, de la cual arginina es precursor (Brosnan y Brosnan, 2007). Aproximadamente 50% de la metionina y treonina ingerida es utilizada por el intestino (Stoll *et al.*, 1999).

Treonina mostró un aumento de 51%. La treonina se encuentra relacionada a la síntesis de mucina, la cual aumenta bajo condiciones de EC (Pearce *et al.*, 2014). La mucina se encuentra relacionada a lo anterior debido a su función al actuar como barrera para proteger la superficie de células epiteliales de microorganismos, toxinas y partículas (Pearce *et al.*, 2015).

Triptófano mostró un aumento de 33% con la suplementación de arginina. Este AA se encuentra relacionado a la síntesis de melatonina y serotonina, los cuales están involucrados en procesos digestivos (motilidad y apetito) y si existe una baja concentración de este AA en las dietas, influye en el crecimiento (Henry *et al.*, 1996).

Histidina mostró un aumento de 34% y este incremento es importante debido a su esencialidad para el crecimiento, reparación de tejidos y respuesta antioxidante (Peterson *et al.*, 1998). Según Peterson *et al.*, (1998), histidina juega un papel importante en la eliminación de radicales libres generadas por inflamación.

Alanina mostró una reducción de 62%, siendo el único AA no esencial que mostró una tendencia a ser diferente entre los tratamientos. Alanina es un AA no esencial, formada a partir de la desaminación del glutamato que tiene como función ser fuente importante de energía para los músculos (ciclo de Krebs), y tiene una participación como

regulador en el metabolismo de glucosa (glucogénesis), en los cuales arginina también interviene, lo que posiblemente causó la reducción (Kamei *et al.*, 2018).

Resultados similares a los del presente trabajo fueron reportados por Urschel *et al.* (2006), quienes alimentaron cerdos en TN con adición de L-arginina, en comparación con una dieta basal, reportando un aumento en la concentración de arginina, metionina, treonina y triptófano, asociando el aumento a su esencialidad para los animales para mantener su crecimiento.

Hu *et al.* (2015) demostraron que la concentración de arginina en cerdos bajo condiciones de TN aumentaba de forma gradual al suplementar con 0%, 1%, 1.5% y 2% de L-arginina, siendo la suplementación de 2% el tratamiento con mayor concentración.

Ewtushik *et al.* (2000) reportaron que las CS de arginina fueron mayores (+88%) en lechones bajo el estrés de destete temprano alimentados con una dieta con 0.93% de L-arginina en comparación con lechones alimentados con una dieta estándar. Zhan *et al.* (2008) reportaron un aumento en la concentración de arginina en la sangre a partir del día 6 en lechones destetados de forma temprana, suplementados con L-arginina.

5.7. Análisis de morfología intestinal

La integridad de la morfología intestinal es un indicativo del buen funcionamiento del intestino delgado, así como las condiciones en que se encuentran las vellosidades y criptas, involucrados en la absorción de nutrientes (Yu *et al.*, 2010). En los resultados de los tres segmentos del intestino delgado se obtuvieron mayores valores de altura de vellosidades ($P < 0.05$) en los cerdos alimentados con arginina cristalina añadida a la dieta. En el ancho de las vellosidades no hubo diferencias entre los tratamientos en los tres segmentos. En cuanto a la profundidad y ancho de la cripta, no se encontraron diferencias significativas en los tres segmentos del intestino delgado (Cuadro 10).

Cuadro 10. Mediciones morfológicas (μm) de vellosidades de las muestras de intestino delgado de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.

Segmento, μm	Tratamientos		EEM	P
	Est	Est+Arg		
Altura de vellosidades				
Duodeno	228	281	12.88	0.010
Yeyuno	255	286	7.31	0.010
Íleon	207	241	7.44	0.010
Ancho de vellosidades				
Duodeno	45	45	2.02	0.434
Yeyuno	47	43	2.91	0.495
Íleon	40	39	2.09	0.411
Profundidad de cripta				
Duodeno	111	122	7.21	0.412
Yeyuno	115	109	4.25	0.398
Íleon	91	98	4.80	0.385
Ancho de cripta				
Duodeno	7	7	3.32	0.701
Yeyuno	7	7	3.00	0.725
Íleon	7	7	5.47	0.896

En los tres segmentos del intestino delgado, la relación V:C fue similar entre los tratamientos. Los resultados mostraron datos menores a 3 (relación normal), indicando una arquitectura de la vellosidad no uniforme (Hammer *et al.*, 2013) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Relación altura de vellosidad:profundidad de cripta (V:C) de las muestras de intestino delgado de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.

Segmento	Tratamientos		EEM	P
	Est	Est+Arg		
Duodeno	2.2	2.4	0.04	0.148
Yeyuno	2.4	2.9	0.27	0.198
Íleon	2.4	2.6	0.16	0.630

El tracto gastrointestinal tiende a ser altamente sensible a cargas de calor (Kregel, 2002). El EC causa cambios en el funcionamiento e integridad gastrointestinales, que pueden ser perjudiciales para la salud, rendimiento y bienestar del animal (Cui y Gu, 2015). Por ejemplo, el EC agudo tiene efectos de hipoxia e inflamación del epitelio intestinal, con afectación de proteínas de unión estrecha (occludina, claudina y quinasa de cadena ligera de miosina), que contribuyen al mantenimiento de la función e integridad intestinal (Qi *et al.*, 2011; Pearce *et al.*, 2013).

Investigaciones como las de Yu *et al.* (2010), Pearce *et al.* (2013) y Cui y Gu (2015) han demostrado que una exposición constante de cerdos a EC, produce un acortamiento en la altura de las vellosidades y profundidad de la cripta, que deriva en una menor área para absorber nutrientes que pasan por el intestino, y en una disminución en la proliferación y diferenciación celular. Además, existe un incremento en la permeabilidad intestinal, que permite paso a endotoxinas llevando a un rendimiento bajo y un incremento en la mortalidad (Liu *et al.*, 2009).

Se sugiere que arginina puede ayudar en el cambio de la morfología intestinal provocada por el EC, debido a que es precursor de poliaminas, que tienen como función principal la diferenciación, migración y proliferación celular, por lo que es muy probable su participación en la regeneración epitelial en el intestino delgado (Flynn *et al.*, 2009).

Yang *et al.* (2016) adicionaron arginina cristalina a dietas de lechones que se encontraban bajo condiciones de estrés severo por el destete, y reportaron aumentos en la altura de las vellosidades de los tres segmentos del intestino, al agregar 0.4% y 0.8% de L-arginina. Estos autores registraron que la profundidad de las criptas en íleon, fue mayor cuando los lechones recibieron suplementación con L-arginina. Esto difiere con el presente estudio, en el que no se encontraron diferencias. Yang *et al.* (2016) atribuyen estos aumentos a la arginina extra, ya que, siendo precursor de ON (principal vasodilatador), es posible que aminorara la atrofia del intestino, resultado del estrés del destete. Aunado a esto, posiblemente hubo un aumento en la síntesis de poliaminas, propiciando que la proliferación celular aumentara y la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas se acrecentaran.

Wu *et al.* (2010) reportaron de lechones recién destetados con una suplementación de L-arginina tienen un aumento en la altura de las vellosidades de los tres segmentos y criptas más profundas en yeyuno e íleon, en comparación con lechones alimentados con una dieta basal.

Otros resultados similares a los del presente experimento fueron reportados por Ewtushik *et al.* (2000), en los que cerdos bajo condiciones de destete temprano, que fueron suplementados con L-arginina, mostraron un aumento en la altura de vellosidades en duodeno en comparación con los del tratamiento control. En ese estudio, los resultados de profundidad de cripta fueron similares, ya que fueron similares entre los tratamientos control y L-arginina añadida a la dieta. Se especula que arginina puede incrementar la capacidad de absorción del intestino al incrementar su área de superficie (Ewtushik *et al.*, 2000).

También, Zhan *et al.* (2008) demostraron en su investigación, que lechones estresados por un destete temprano y suplementados con 0.7% de L-arginina tuvieron un aumento en la altura de vellosidades de los tres segmentos y en la profundidad de las criptas en duodeno y yeyuno; en comparación con lo observado en lechones alimentados con una dieta control y una dieta suplementada con 1.2% de L-arginina.

5.8. Expresión relativa de transportadores de aminoácidos

En duodeno de cerdos alimentados con Est+Arg se encontró una expresión relativa 90% tendencialmente mayor del transportador y+L ($P=0.096$), 220% superior de B0 ($P=0.141$), y 390% superior de transportador $b^{0,+}$ ($P=0.016$) que en los cerdos tratados con la dieta estándar (Est; Figura 7), siendo esta la más notoria diferencia en duodeno asociada a la adición extra de arginina a la dieta.

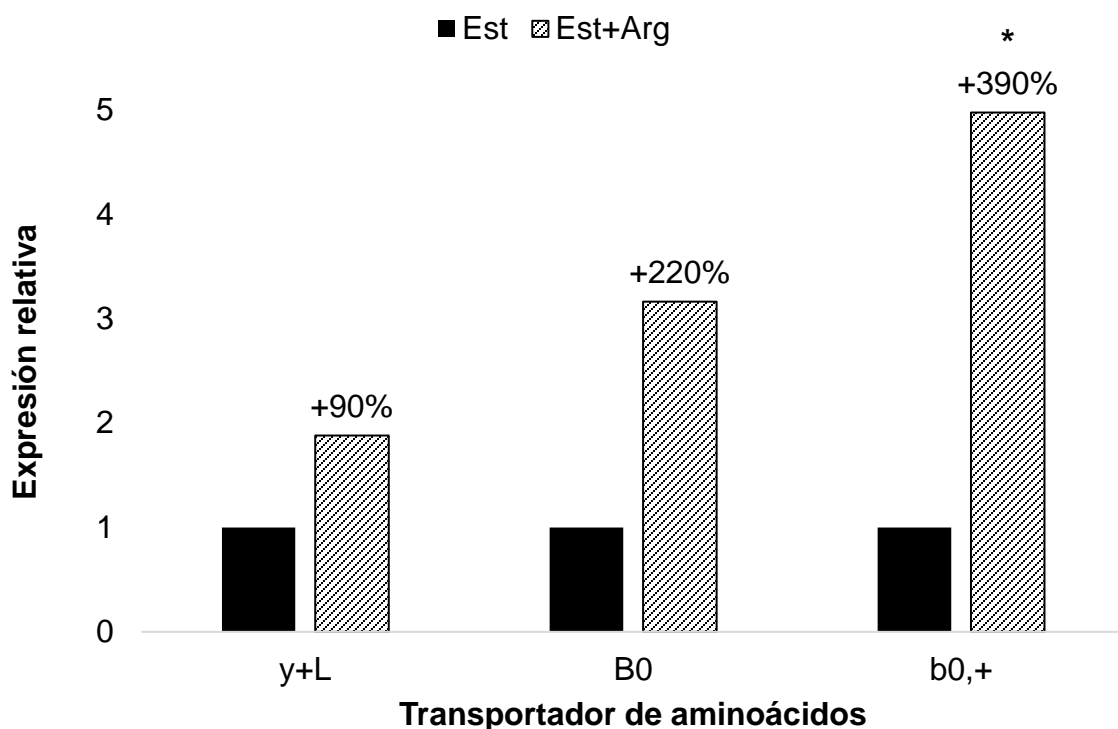


Figura 7. Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de mRNA que codifica para transportadores de aminoácidos y+L ($P=0.096$), B0 ($P=0.141$) y $b^{0,+}$ ($P=0.016$) en duodeno de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.

Para la sección de yeyuno la expresión relativa de los tres transportadores (y+L, B0, y b^{0,+}) fue similar (P=0.722; P=0.969; y P=0.610, respectivamente) para los cerdos con arginina suplementada en comparación con los alimentados con la dieta Est. Los resultados estadísticos no alcanzaron los niveles de diferencia significativa (P>0.05) por lo que se puede decir que al suplementar con arginina cristalina no se modifica la expresión relativa de los transportadores de AA mencionados de yeyuno (Figura 8).

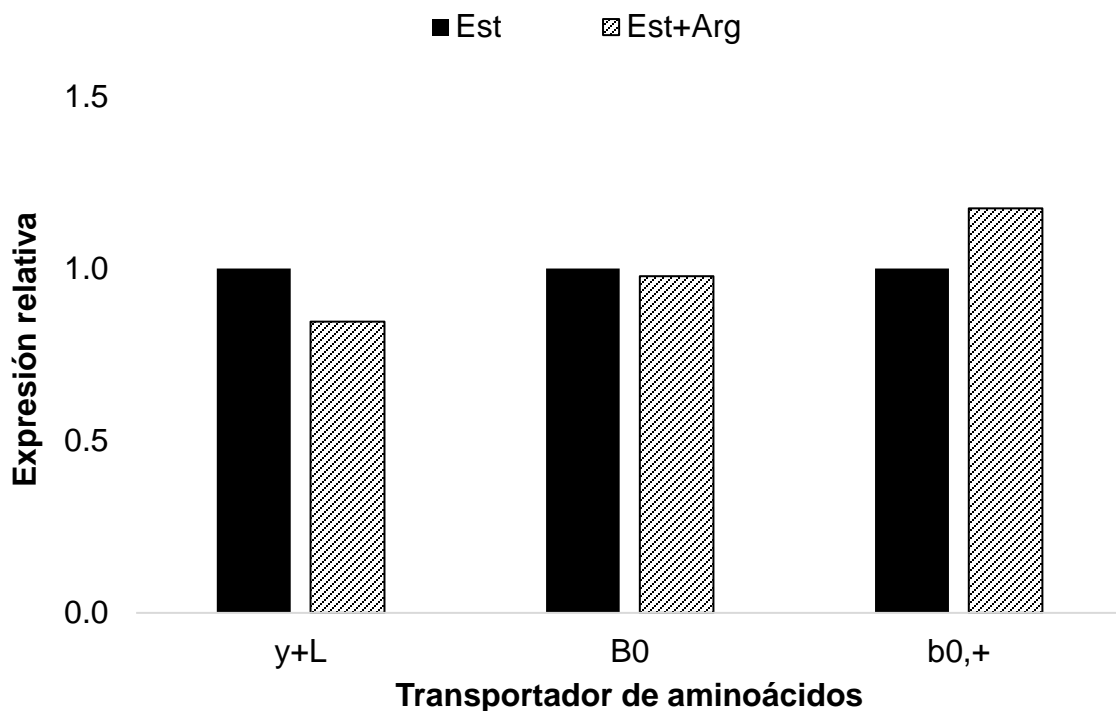


Figura 8. Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de mRNA que codifica para transportadores de aminoácidos y+L (P=0.722), B0 (P=0.969) y b^{0,+} (P=0.610) en yeyuno de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.

En el caso del íleon la expresión relativa de los tres transportadores (y+L, B0, y b^{0,+}) fue similar (P=0.415; P=0.811; y P=0.446, respectivamente) para los cerdos alimentados con dieta suplementada con arginina, en comparación con la expresión de los cerdos alimentados con la dieta Est.

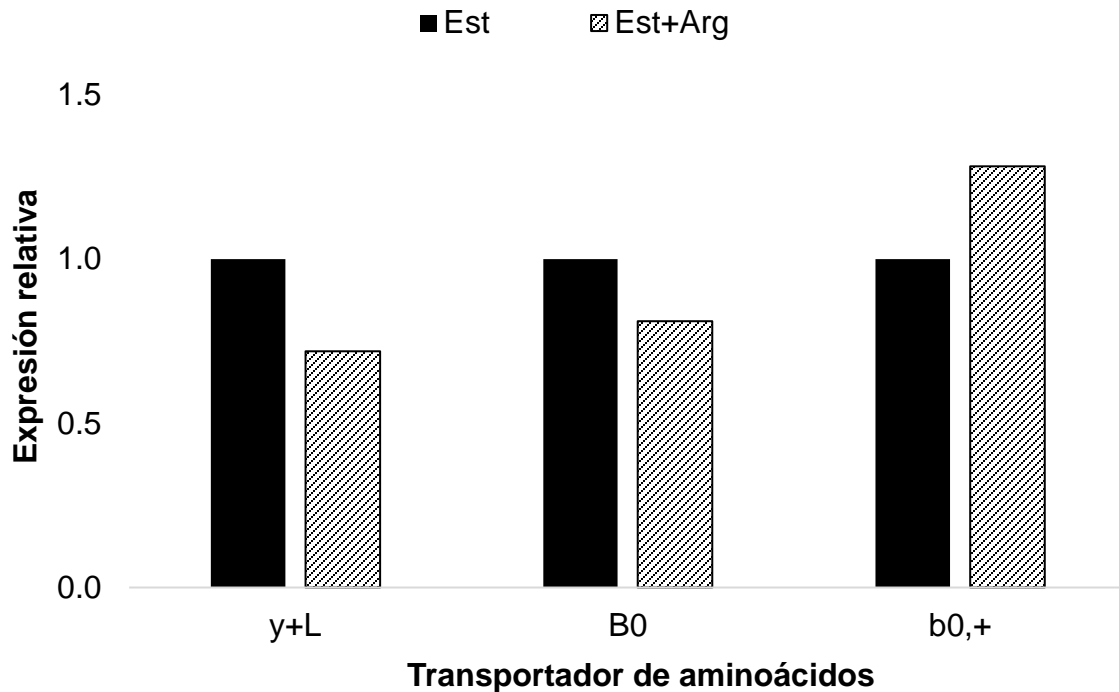


Figura 9. Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de mRNA que codifica para transportadores de aminoácidos y+L (P=0.415), B0 (P=0.811) y b^{0,+} (P=0.446) en íleon de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.

Los resultados de la abundancia de transportadores de AA aparentan estar estrechamente relacionados con los resultados de morfología intestinal y concentraciones séricas de AA. Según Liu *et al.*, (2009), las condiciones de la morfología intestinal y la absorción de nutrientes se encuentran relacionadas, y reflejan el estado en el que se encuentra el intestino y su buen funcionamiento fisiológico, ya que, si la

integridad intestinal se ve afectada, entonces los sistemas de transporte de nutrientes y la permeabilidad, así como la absorción, disminuyen y por lo tanto la concentración de los nutrientes en la sangre se ve disminuida (Ferraris y Carey, 2000; Yu *et al.*, 2010).

Estudios previos (Morales *et al.*, 2014b; Cervantes *et al.*, 2016) han mostrado que el EC modifica la expresión génica que codifica para transportadores de AA en diferentes tejidos, tales como intestino, hígado y músculo. Sobre todo, se ha propuesto que el daño al epitelio intestinal producido por el aumento de temperatura se asocia con el redireccionamiento del flujo sanguíneo hacia la superficie corporal, lo cual puede provocar falta de oxígeno (hipoxia) y una atrofia en el intestino (Yu *et al.*, 2010).

Se especula que arginina puede ayudar a aumentar la abundancia de los transportadores de AA, debido a sus funciones en el intestino delgado, siendo precursor de ON (vasodilatación), poliaminas (proliferación celular) y creatina (formadora de actividad antioxidante), los cuales posiblemente actúan para aminorar la atrofia intestinal, aumentar la regeneración del epitelio intestinal y disminuir el daño oxidativo celular causados por el EC (Hall *et al.*, 2001; Flynn *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009).

Los resultados del presente trabajo mostraron un aumento en la expresión relativa de los transportadores $b^{0,+}$ y B0 en el duodeno de cerdos suplementados con arginina. Existe una posibilidad de que este aumento posiblemente se relacione con el aumento en altura de vellosidades, debido a que se tiene una mayor superficie para absorber los nutrientes (Xia *et al.*, 2005). Además, posiblemente se encontró este aumento en duodeno debido a que se ha demostrado que los AA en forma libre no requieren de digestión proteica para quedar disponibles para su transporte y por ello es probable que la estimulación de la expresión de los transportadores B0 y $b^{0,+}$, necesarios para el transporte de AA catiónicos, haya aumentado en el primer segmento del intestino (duodeno). (Sunde *et al.*, 2003).

El transportador $b^{0,+}$ es un sistema que participa en el transporte de AA neutros y catiónicos de alta afinidad, su accionar es independientes de sodio, y se encuentra en el área apical del enterocito (Palacín *et al.*, 1999). El sistema $b^{0,+}$ es un sistema antiporte, que transporta los AA catiónicos del lumen intestinal hacia el enterocito, y en sentido

contrario, del enterocito hacia el lumen intestinal a los AA neutros (Palacín *et al.*, 2005). El transportador y+L participa en el transporte de AA catiónicos, en acción independiente de sodio, mientras que transporta AA neutros en acción dependiente de sodio. El sistema y+L se encuentra en el área basolateral del enterocito (Bröer *et al.*, 2000; Fotiadis *et al.*, 2013). Al igual que $b^{0,+}$, y+L es un sistema antiporte que transporta AA catiónicos del enterocito hacia el espacio basolateral y AA neutros junto con sodio del espacio basolateral al enterocito (Palacín *et al.*, 2005) (Figura 1).

El aumento de las CS de arginina e histidina puede asociarse a la expresión de los transportadores $b^{0,+}$, y+L. Tanto histidina como arginina son AA catiónicos transportados por los mismos sistemas transportadores de AA. En cambio, metionina, treonina, triptófano son AA neutros que probablemente hayan sido transportados por ambos sistemas de transportadores, así como posiblemente los sistemas LAT2 y TAT1, que transportan los AA neutros al área basolateral para después ser absorbidos al torrente sanguíneo (Palacín *et al.*, 2005).

5.9. Expresión relativa de enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas

Arginina es el principal precursor de poliaminas, cuya función principal es la proliferación, migración y diferenciación celular (transcripción y síntesis de DNA), y que se encuentran asociados al mecanismo de reparación del epitelio intestinal (Flynn *et al.*, 2009). En el presente estudio se analizó la expresión de los ARN mensajeros de tres enzimas clave, involucradas en la síntesis de poliaminas (ODC y SSAT) y arginina (ASS). La enzima ASS tiene actividad a partir de la citrulina para formar arginina succinato y posteriormente ASL actúa para formar arginina (Lam *et al.* 2018).

ODC es una enzima de suma importancia en la síntesis de poliaminas, debido a que regula la síntesis de putrescina a partir de ornitina, formada de arginina (Wu *et al.*, 2009). Por otro lado, SSAT es una enzima encargada de la degradación de espermina y espermidina (Pegg, 2008), oxidando espermina para formar espermidina y oxidando espermidina para formar putrescina (Teixeira *et al.*, 2002) (Figura 10).

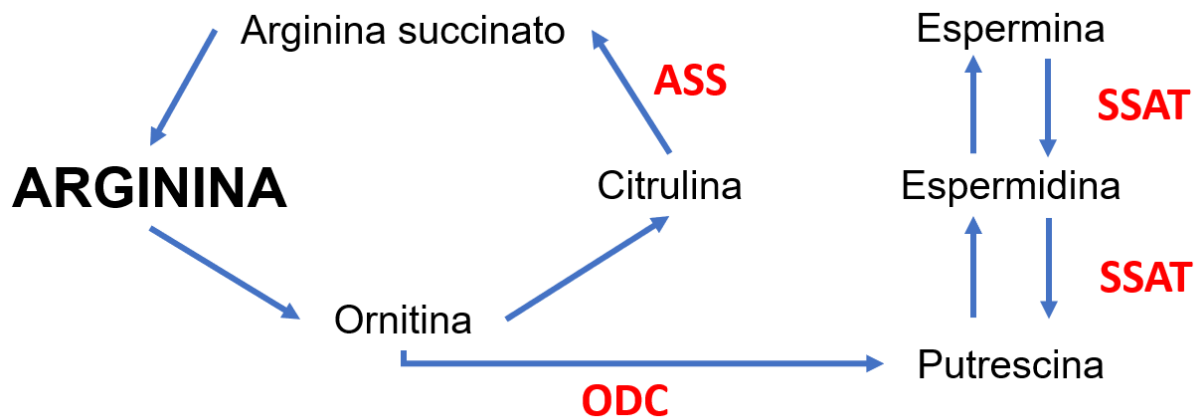


Figura 10. Enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas. ASS, arginina succinato sintasa; ODC, ornitina descarboxilasa; y SSAT, espermina/espermidina acetiltransferasa (Lam *et al.*, 2018).

En el presente estudio la expresión relativa de las tres enzimas analizadas en duodeno fue similar para los cerdos alimentados con Est+Arg y para los alimentados con Est.

Dado que las diferencias entre los tratamientos no alcanzaron el nivel de significancia estadística ($P>0.05$), se puede resumir que la suplementación con arginina no modificó la expresión relativa de las enzimas SSAT, ODC y ASS en los segmentos del intestino delgado (Figura 11).

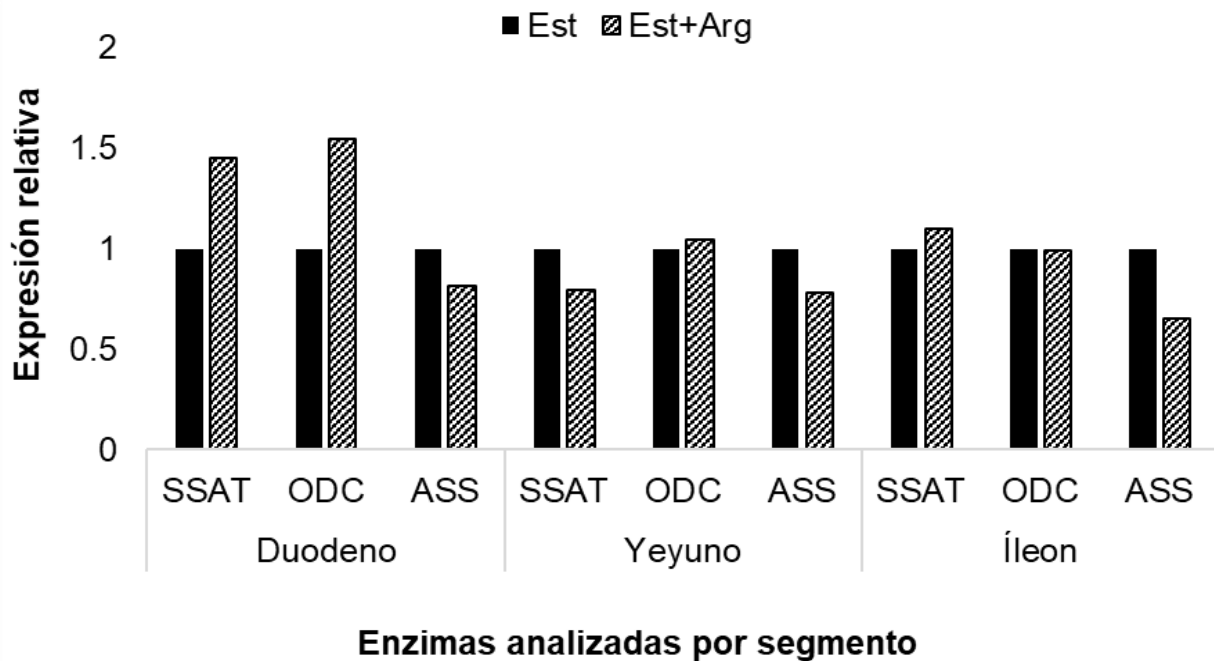


Figura 11. Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de mRNA que codifica para enzimas asociadas a la síntesis de arginina y poliaminas SSAT ($P>0.05$), ODC ($P>0.05$) y ASS ($P>0.05$) en duodeno, yeyuno e íleon de los cerdos alimentados con una dieta estándar (Est) o adicionada con arginina (Est+Arg) criados en condiciones de estrés por calor.

La proliferación y diferenciación celular es entre otras cosas, dependiente del contenido de poliaminas, lo cual puede ser efecto de diversos mecanismos (Thomas y Thomas, 2001). Uno de estos mecanismos implicados es la disponibilidad de arginina para mantener la síntesis de putrescina; sin embargo, existen pocas investigaciones que prueben la respuesta de la concentración de poliaminas en el intestino considerando la disponibilidad de arginina (Teixera *et al.*, 2002).

De acuerdo a Schertel y Eichler (1991), los niveles de poliaminas y la actividad enzimática no se encuentran necesariamente relacionadas. Este puede ser uno de los factores del por qué se aumentó la altura de las vellosidades, pero la expresión relativa de las enzimas no fueron diferentes entre los tratamientos. Sin embargo, de acuerdo a Butcher *et al.* (2007), la actividad enzimática posiblemente es inducida por mecanismos que pueden estimular procesos fisiológicos, tales como toxinas, radicales libres y estrés.

Estudios de Teixera *et al.* (2002) reportaron cambios en concentraciones de poliaminas en ratones alimentados con dos niveles de L-arginina (1.12% y 2.24%) comparando con una dieta sin suplementación. En los primeros 15 días de suplementación, los ratones no mostraron diferencias en concentraciones de poliaminas. Sin embargo, a partir del día 30 de suplementación, se mostraron cambios en concentraciones de espermidina en intestino. La explicación a esto es que probablemente a los 30 días de experimentación, L-arginina determinó los niveles de espermidina en el intestino. En intestino, el consumo de arginina se correlacionó de manera positiva con los niveles de espermidina, así como niveles de ornitina en músculo, a pesar de que en este tejido se haya visto bajas cantidades de ODC (Schertel y Eichler, 1991; Teixera *et al.*, 2002).

El presente estudio tuvo una duración de 21 días y en este último día ocurrió la toma de muestras para el análisis molecular. Probablemente la expresión de las enzimas no mostró diferencias, debido a una adaptación a la suplementación, por medio de la cual mostró un aumento de la altura de las vellosidades, mientras que posiblemente el requerimiento de poliaminas para la proliferación celular de los animales al día 21 era más bajo en comparación con los primeros días del experimento, cuando los cerdos comenzaban su adaptación a la suplementación con arginina y presentaban una

deficiencia nutricional (AA). El efecto que tiene el consumo de arginina en las concentraciones de poliaminas cambia conforme el tiempo de consumo, lo que respalda la idea de que la actividad de las poliaminas se adapta a la disponibilidad de arginina en la dieta y a la necesidad de los órganos sintetizar poliaminas (Schertel y Eichler, 1991). Es importante destacar que además del intestino delgado, las poliaminas pueden ser sintetizadas en otros tejidos (hígado, timo, riñón, bazo, corazón, músculos, pulmón y testículos), las cuales pueden ser utilizadas y/o acumuladas por otros órganos de acuerdo a las necesidades del animal (Teixera *et al.*, 2002).

6. CONCLUSIONES

Los cerdos estuvieron bajo condiciones de estrés por calor durante el experimento con valores muy altos de índice de temperatura y humedad.

La suplementación de la dieta con arginina no afectó los parámetros productivos (ganancia de peso, consumo de alimento y eficiencia alimenticia) en comparación con aquellos alimentados con la dieta estándar (Est).

La concentración sérica de aminoácidos, especialmente arginina, histidina, metionina, treonina, triptófano y alanina se modificó debido a la suplementación de arginina en la dieta de cerdos en estrés por calor.

La adición de arginina en la dieta tuvo un efecto en la morfología intestinal, aumentando la altura de las vellosidades en los tres segmentos del intestino delgado.

La abundancia de los transportadores $b^{0,+}$ y $y+L$ tuvo un incremento en duodeno de los cerdos suplementados con arginina.

Literatura citada

- Arancibia-Garavilla, Y., F. Toledo, P. Casanello, L. Sobrevia. 2003. Nitric oxide synthesis requires activity of the cationic and neutral amino acid transport system y+L in human umbilical vein endothelium. *Exp. Physiol.* 88: 699-710.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18° Edición, Gaersburg, MD, USA.
- Bernabucci, U., L. Basirico, D. Pirazzi, F. Rueca, N. Lacetera, E. Lepri, A. Nardone. 2009. Liver apolipoprotein B 100 expression and secretion are down-regulated early postpartum in dairy cows. *Livest. Sci.* 125: 169-176.
- Bröer, A., C. Wagner, F. Lang, S. Bröer. 2000. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem. J.* 349: 787-795.
- Bröer, S. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelial. *Physiol. Rev.* 88: 249-286.
- Brosnan, J. and M. Brosnan. 2007. Creatine: Endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. *Annual. Reviews* 27: 241-261.
- Butcher, N., G. Broadhurst, R. Minchin. 2007. Polyamine-dependent regulation of spermidine-spermine N1-acetyltransferase mRNA translation. *J. Biol. Chem.* 39: 28530-28539.
- Camargo, S., D. Singer, V. Makrides, K. Huggel, K. Pos, C. Wagner, K. Kuba, U. Danilczyk, F. Skovby, R. Kleta, J. Penninger, F. Verrey. 2009. Tissue-specific amino acid transporter partners ACE2 and collectrin differentially interact with hartnup mutations. *Gastroenterology* 136: 872-882.

- Campos, P., N. Le Floch, J. Noblet, D. Renaudeau. 2017. Physiological responses of growing pigs to high ambient temperature and/or inflammatory challenges. *R. Bras. Zootec.* 46(6): 537-544.
- Castillo, L., T. Chapman, Y. Yu, A. Ajami, J. Burke, V. Young. Dietry arginine uptake by the splanchnic region in adult humans. *Am. J. Physiol.* 265: 532-539
- Cervantes, M., M. Cota, N. Arce, G. Castillo, E. Avelar, S. Espinoza, A. Morales. 2016. Effect of heat stress on performance and expression of selected amino acid and glucose transporters, HSP90, leptin and ghrelin in growing pigs. *J. Therm. Biol.* 59: 69-76.
- Cervantes, M., N. Ibarra, N. Vásquez, F. Reyes, E. Avelar, S. Espinoza, A. Morales. 2017. Serum concentrations of free amino acids in growing pigs exposed to diurnal heat stress fluctuations. *J. Therm. Biol.* 69: 69-75.
- Collin, A., J. Van Milgen, S. Dubois, J. Noblet. 2001. Effect of high temperature on feeding behaviour and heat production in group-housed young pigs. *Br. J. Nutr.* 86: 63-70.
- Cui, Y. and X. Gu. 2015. Proteomic changes of the porcine small intestine in response to chronic heat stress. *J. Mol. Endocrinol.* 55: 277-293.
- Curtis T., J. Schindelin, M. Hiner, B. De Zonia, A. Walter, E. Arena, K. Eliceiri. 2017 ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18: 529.
- Cynober, L. 1994. Can arginine and ornithine support gut functions? *Gut* 35: 12-15.
- De Bandt, J., L. Cynober, S. Lim. C. Coudray-Lucas, R. Poupon, J. Giboudeau. 1990. Métabolismes comparés de l'ornithine et de l'arginine dans un système de foie isolé perfusé. *Nutr. Clin. Métabol.* 4: 46.
- Ewtushik, A., R. Bertolo, R. Ball. 2000. Intestinal development of early-weaned piglets receiving diets supplemented with selected amino acids or polyamines. *Can. J. Anim. Sci.* 80: 653-662.

- Fairweather, S., A. Bröer, N. Subramanian, E. Tumer, Q. Cheng, D. Schmoll, M. O'Mara, S. Bröer. 2015. Molecular basis for the interaction of the mammalian amino acid transporters B(0)AT1 and B(0)AT3 with their ancillary protein collectrin. *J. Biol. Chem.* 290(40): 24308-24325.
- FAO – Food and Agriculture Organization. 2010. *FAO Production Yearbook 2010*. FAOSTAT, Roma, Italia.
- Ferrerira, R., R. de Oliveira, J. Donzele, E. Saraiva, F. Silva, U. Orlando, R. Vaz. 2007. Reduction of dietary crude protein levels and amino acid supplementation for 30 to 60 kg barrows maintained in a high environment temperature. *Rev. Bras. Zootec.* 36: 818-824.
- Flynn, N., C. Meininger, T. Haynes, G. Wu. 2002. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacoter.* 56: 427-438.
- Flynn, N., J. Bird, A. Guthrie. 2009. Glucocorticoid regulation of amino acid and polyamine metabolism in the small intestine. *Amino Acids* 37: 123.
- Fotiadis, D., Y. Kanai, M. Palacín. 2013. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol. Aspects Med.* 34: 139-158.
- Frenhani, P. and R. Burini. 1999. Mechanism of action and control in the digestion of proteins and peptides in humans. *Arquivos de Gastroenterologia* 36(3): 139-47.
- Grillo, M. 1985. Metabolism and function of polyamines. *Int. J. Biochem.* 17: 943-948.
- Grillo, M., A. Lanza, S. Colombatto. 2008. Transport of amino acids through the placenta and their role. *Amino Acids* 34: 517-523.
- Hall, D., G. Buettner, L. Oberley, L. Xu, R. Matthes, C. Gisolfi. 2001. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *Am. J. Physiol* 280: 509-521.

- Hatzoglou, M., J. Fernández, I. Yaman, E. Closs. 2004. Regulation of cationic amino acid transport: the story of the Cat-1 transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4: 478-481.
- Heger, J. 2003. Essential to non-essential amino acid ratios. *Amino acids in farm animal nutrition*. Second edition, Ed. CAB International, Edinburgh, pp. 103-124.
- Henry, Y., B. Séve, A. Mounier, P. Ganier. 1996. Growth performance and brain neurotransmitters in pigs as affected by tryptophan, protein and sex. *J. Anim. Sci.* 74: 2700-2710.
- Herzfeld, A. and S. Raper. 1976. The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem. J.* 153: 469-478.
- Horowitz, M., L. Eli-Berchoer, I. Wapinski, N. Friedman, E. Kodesh. 2004. Stress-related genomic responses during the course of heat acclimation and its association with ischemic-reperfusion cross-tolerance. *J. Appl. Physiol.* 97: 1496-1507.
- Hu, S., X. Li, R. Rezaei, C. Meiningen, C. McNeal, G. Wu. 2015. Safety of long-term dietary supplementation with L-arginine in pigs. *Amino Acids* 47: 925-936.
- Huyhn, T., A. Aarnink, W. Gerrits, M. Heetkamp, T. Canh, H. Spolder, B. Kemp, M. Verstegen. 2005. Thermal behaviour of growing pigs in response to high temperature and humidity. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 91: 1-16.
- IPCC. 2018. Special Report: Global Warming of 1.5 °C. Incheon, Republic of Korea.
- Jobgen, W., C. Meiningen, S. Jobgen, P. Li, M. Lee, S. Smith, T. Spencer, S. Fried, G. Wu. 2006. Dietary L-arginine supplementation reduces white-fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J. Nutr.* 139: 230-237.
- Johnson, L. 1989. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physiol. Rev.* 68: 456-502.

- Kamei, S., J. Hibi, Y. Ohtsubo, H. Watanabe, S. Kimura. 2018. Infrared evaluation of enantiomeric amount and application to racemization at the interface between L- and D-alanine. *Appl. Spectrosc.* 72(7): 1074-1079.
- Kiryama, Y. and H. Nochi. 2016. D-Amino acids in the nervous and endocrine systems. *Scientifica (Cairo)* 2016: 6494621.
- Kregel, K. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92(5): 2177-2186.
- Lam, S., K. Pong U, Y. Li, S. Xu, P. Cheng, J. Ho. 2018. Inhibition of ornithine decarboxylase 1 facilitates pegylated arginase treatment in lung adenocarcinoma xenograft models. *Oncol. Rep.* 20: 1994-2004.
- Lawler, J., W. Barnes, G. Wu, W. Song, S. Demaree. 2001. Direct antioxidant properties of creatinine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 47-52.
- Li, P., Y. Yin, D. Li, S. Kim, G. Wu. 2007. Amino acids and immune function. *Br. J. Nutr.* 98: 237-252.
- Liao, S., E. Vanzant, D. Harmon, K. McLeod, J. Boling, J. Matthews. 2009. Ruminant and abomasal starch hydrolysate infusions selectively decrease the expression of cationic amino acid transporter mRNA by small intestinal epithelia of forage-fed beef steer. *J. Dairy Sci.* 92: 1124-1135.
- Lin, L., S. Yee, R. Kim, K. Giacomini. 2015. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 14: 543-560.
- Liu, F., J. Yin, M. Du, P. Yan, J. Xu, X. Zhu, J. Yu. 2009. Heat stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with down regulation of epithelial growth factor signaling. *J. Anim. Sci.* 59: 1941-1949.
- Liu, F., E. de Ruyter, R. Athorn. 2018. Effects of L-citrulline supplementation on heat stress physiology, lactation performance and subsequent reproductive performance of sows in summer. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 103: 251-257.

- Livak, K. and T. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-DDCt} method. *Methods* 25: 402-408
- Llames, C. and J. Fontaine. 1994. Determination of amino acid in feeds: collaborative study. *J. AOAC Int.* 77: 1362-1402.
- Luna, L. 1968. Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3° Edición. McGraw-Hill. New York, USA. pp. 15-41
- Majumder, M., I. Yaman, F. Gaccioli, V. Zeenko, C. Wang, M. Caprara, R. Venema, A. Komar, M. Snider, M. Hatzoglou. 2009. The hnRNA-binding proteins hnRNPL and PTB are required for efficient translation of the Cat-1 arginine/lysine transporter mRNA during amino acid starvation. *Mol. Cell. Biol.* 29: 2899-2912.
- McDonald, P., R. Edwards, J. Greenhalgh, C. Morgan, L. Sinclair, R. Wilkinson. 2010. *Animal Nutrition. Seventh Edition.* Pearson Ed. Edinburgh, England, pp. 53-58.
- Meijer, A., W. Lamers, R. Chamuleau. 1990. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol. Rev.* 70: 701-748.
- Miyasaki, M. and K. Esser. 2009. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J. Appl. Physiol.* 106: 1367-1373.
- Morales, A., H. García, N. Arce, M. Cota, R. Zijlstra, A. Araiza, M. Cervantes. 2014. Effect of L.lysine on expression of selected genes, serum concentration of amino acids, muscle growth and performance of growing pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99: 701-709.
- Morales, A., F. Grageola, H. García, N. Arce, B. Araiza, J. Yáñez, M. Cervantes. 2014b. Performance, serum concentrations and expresión of selected genes in pair-fed growing pigs exposed to high ambient temperaturas. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98: 928-935.
- Morales, A., L. Buenabad, G. Castillo, N. Arce, B. Araiza, J. Htoo, M. Cervantes. 2015. Low-protein amino acid-supplemented diets for growing pigs: Effect on

expression of amino acid transporters, serum concentration, performance, and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 93: 2154-2164.

Morales, A., L. Buenabad, G. Castillo, N. Vásquez, S. Espinoza, J., Htoo, M. Cervantes. 2016a. Dietary levels of protein and free amino acids affect pancreatic proteases activities, amino acids transporters expression and serum amino acid concentrations in starter pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101: 723-732.

Morales, A., M. Cota, N. Ibarra, N. Arce, J. Htoo, M. Cervantes. 2016b. Effect of heat stress on the serum concentrations of free amino acids and some of their metabolites in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 94: 2835-2842.

Morris, S. 1998. Arginine synthesis, metabolism, and transport: regulators of nitric oxide synthesis. *Cellular and Molecular Biology of Nitric Oxide*, New York, USA. pp. 57-85.

Morris, S. 2007. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J. Nutr.* 137: 1602-1609.

Moskovitz, J., S. Bar-Noy, W. Williams, J. Requena, B. Berlett, E. Stadtman. 2001. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 12920-12925.

Noblet, J., H. Fortune, X. Shi, S. Dubois. 1994. Prediction of net energy value of feeds for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 72: 344-354.

Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ochoa, M., I edición. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana, Cd. de México (DF), México, pp. 1-58.

National Research Council. 2012. Nutrient Requirements of Pigs. 10° Edición. National Academy Press, Washington, USA.

- O'Quinn, P., D. Knabe, G. Wu. 2002. Arginine catabolism in lactating porcine mammary tissue. *J. Anim. Sci.* 80: 467-474.
- Palacín, M., R. Estévez, J. Bertran, A. Zorzano. 1999. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78: 969-1054.
- Palacín, M., V. Nunes, M. Font-Llitjós, M. Jiménez-Vidal, J. Fort, E. Gasol, M. Pineda, L. Feliubadaló, J. Chillarón, A. Zorzano. 2005. The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology* 20: 112-124.
- Pahlavani, N., M. Jafari, O. Sadeghi, M. Rezaei, H. Rasad, H. Rahdar, M. Entezari. 2017. L-arginine supplementation and risk factors of cardiovascular diseases in healthy men: a double-blind randomized clinical trial. *Research* 3: 306
- Patience, J., J. Umboh, R. Chaplin, C. Naychoti. 2005. Nutritional and physiological responses of growing pigs exposed to a diurnal pattern of heat stress. *Livest. Prod. Sci.* 96: 205-215.
- Pearce, S., V. Mani, T. Weber, R. Rhoads, J. Patience, L. Baumgard, N. Gabler. 2013. Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *J. Anim. Sci.* 91: 5183-5193.
- Pearce S., M. Sanz-Fernandez, J. Hollis, L. Baumgard, N. Gabler. 2014. Short-term exposure to heat stress attenuates appetite and intestinal integrity in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 92: 5444–5454.
- Pegg, A. 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234: 249-262.
- Pegg, A. 2008. Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: 995-1010.
- Pérez, J. and N. Trottier. 2001. Effect of dietary arginine supplementation and environmental temperature on sow lactation performance. *Livest. Prod. Sci.* 70: 159-165.

- Peterson, J., I. Boldogh, V. Popov, S. Saini, A. Chopra. 1998. Anti-inflammatory and antisecretory potential of histidine in *Salmonella*-challenged mouse small intestine. *Lab. Invest.* 78: 523-534.
- Pfeiffer, R., G. Rossier, B. Spindler, C. Meier, L. Kuehn, F. Verrey. 1999. Amino acid transport of γ -L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Embo. J.* 18: 49-57.
- Qi, W., S. Joshi, C. Weber, R. Wali, H. Roy, S. Savkovic. 2011. Polyethylene glycol diminishes pathological effects of *Citrobacter rodentium* infection by blocking bacterial attachment to the colonic epithelia. *Gut Microbes* 2: 267-273.
- Ramírez, R. 2007. Los pastos en la nutrición de los rumiantes. México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Renaudeau, D., C. Anais, L. Tel, J. Gourdine. 2010. Effect of temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using a nonlinear function. *J. Anim. Sci.* 88: 3715-3724.
- Renaudeau, D., A. Collin, S. Yahav, V. Basilio, J. Gourdine, R. Collier. 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6: 707-28.
- Renaudeau, D.; J. Gourdine, J. Fleury, S. Ferchaud, Y. Billon, J. Noblet, H. Gilbert. 2014. Selection for residual feed intake in growing pigs: effects on sow performance in a tropical climate. *J. Anim. Sci.* 92(8): 3568-3579.
- Rezaei, R. W. Wang, Z. Wu, Z. Dai, J. Wang, G. Wu. 2013. Biochemical and physiological bases for utilization of dietary amino acids by young pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4(1): 7.
- Rhoads, J. and G. Wu. 2008. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids* 37: 111-122.
- Ross, J., B. Hale, N. Gabler, R. Rhoads, A. Keating, L. Baumgard. 2015. Physiological consequences of heat stress in pigs. *Anim. Prod. Sci.* 55: 1381-1390.

- Rotmann, A., A. Simon, U. Martiné, A. Habermeier, E. Closs. 2007. Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems y⁺ and y⁺L. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292(6): 2259-2268.
- Rotoli, B., O. Bussolati, R. Sala, G. Gazzola, V. Dall'Asta. 2005. The transport of cationic amino acids in human airway cells: Expression of system y⁺L activity and transepithelial delivery of NOS inhibitors. *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB journal)* 19: 810-812.
- Sambrook, J. and D. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3^o Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Schertel, B. and W. Eichler. 1991. Polyamine synthesis in arginine-starved and refed rats. *Biol. Chem.* 372: 27-33.
- Schindeldecker, M. and B. Moosmann. 2015. Protein-borne methionine residues as structural antioxidants in mitochondria. *Amino Acids* 47: 1421-1432.
- Seow, H., S. Bröer, A. Bröer, C. Bailey, S. Potter, J. Cavanaugh, J. Rasko. 2004. Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19. *Nat. Genet.* 36: 1003-1007.
- Sonna, L., J. Fujita, S. Graffin, C. Lilly. 2002. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* 92: 1725-1742.
- Stoll, B., D. Burrin, J. Henry, H. Yu, P. Jahoor, J. Reeds. 1999. Substrate oxidation by the portal drained viscera of fed piglets. *Am. J. Physiol.* 277: 168-175.
- St-Pierre, N., B. Cobanov, G. Schnitkey. 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *J. Dairy Sci.* 86: 52-77.
- Sunde, J., A. Kiessling, D. Higgs, J. Opstvedt, K. Rungruangsak-Torrissen. 2003. Evaluation of feed protein quality by measuring plasma acid in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after dorsal aorta cannulation. *Aquac. Nutr.* 9: 351-360.

- Hammer, S., M. Maneerattanaporn, K. Rude, W. Chey, J. Greenson. 2013. The clinical significance of duodenal lymphocytosis with normal villous architecture: how often is it celiac disease? *Mod. Pathol.* 23: 146-149.
- Hammer, S., and J. Greenson. 2013. The clinical significance of duodenal lymphocytosis with normal villus architecture. *Arch Pathol Lab Med* 137: 1216-1219.
- Teixeira, D., M. Santaolaria, V. Meneu, E. Alonso. 2002. Dietary arginine slightly and variably affects tissue polyamine levels in male swiss albino mice. *J. Nutr.* 132: 3715-3720.
- Thomas, T. and T. Thomas. 2001. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 244-258.
- Torras-Llort, M., D. Torrents, J. Soriano-García, J. Gelpí, R. Estévez, R. Ferrer, M. Palacín, M. Moretó. 2001. Sequential amino acid exchange across b⁰⁺-like system in chicken brush border jejunum. *J. Membr. Biol.* 180: 213-220.
- Torrents, D., R. Estévez, M. Pineda, E. Fernández, J. Lloberas, Y. Shi, A. Zorzano, M. Palacín. 1998. Identification and characterization of a membrane protein (γ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Bio. Chem.* 273: 32437-32445.
- Urriola, P., M. Li, B. Kerr, G. Shurson. 2014. Evaluation of prediction equations to estimate gross, digestible, and metabolizable energy content of maize dried distillers' grains with solubles (DDGS) for swine based on chemical composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 198: 196-202.
- Urschel, K., A. Schoveller, R. Uwiera, P. Pencharz, R. Ball. 2006. Citrulline is an effective arginine precursor in enterally fed neonatal piglets. *J. Nutr.* 136: 1806-1813.

- Van Soest, P., J. Robertson, B. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Van Winkle, L., H. Christensen, A. Campione. 1985. Na⁺-dependent transport of basic, zwitterionic, and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocyst. *J. Biol. Chem.* 260(22): 12118-12123.
- Van Winkle, L., J. Tesch, A. Shah, A. Campione. 2005. System B₀,+ amino acid transporter regulates the penetration stage of blastocyst implantation with possible long-term developmental consequences through adulthood. *Hum. Reprod. Update* 12: 145-157.
- Vásquez, N. 2014. Determinación de fracciones de carbohidratos y proteínas y del valor nutricional de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) asociado con dos subproductos agroindustriales (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Gral. Escobedo, N.L. México, pp. 1-104.
- Villalobos, Y. 2018. Efecto de la dieta alta en proteína intacta o con aminoácidos libres sobre la morfología intestinal y concentración sérica de aminoácidos en cerdos bajo condiciones de estrés por calor (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Gral. Escobedo, N.L. México, pp. 1-65.
- Wang, Z., K. Zahedi, S. Barone, K. Tehrani, H. Rabb, K. Matlin, R. Casero, M. Soleimani. 2004. Overexpression of SSAT in kidney cells recapitulates various phenotypic aspects of kidney ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 1844-1852.
- Wang, J. 2005. Polyamines regulate expression of E-cadherin and play an important role in control of intestinal epithelial barrier function. *Inflammopharmacology* 13: 91-101.
- Wilson, T., and C. Crandall. 2011. Effect of thermal stress on cardiac function. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 39(1): 12-17.

- Wolp, R., N. Rodrigues, M. Zangeronimo, V. Cantarelli, E. Fialho, R. Philomeno, R. Alvarenga, L. Rocha. 2012. Soybean oil and crude protein levels for growing pigs kept under heat stress conditions. *J. Nutr.* 134(3): 489-492.
- Wu, G., D. Knabe, N. Flynn, W. Yan, S. Flynn. 1996. Arginine degradation in developing porcine enterocytes. *Am. J. Physiol.* 271: 913-919.
- Wu, G. and S. Morris. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336: 1-17.
- Wu, G., D. Knabe, S. Kim. 2004. Arginine nutrition in neonatal pigs. *J. Nutr.* 134: 2370-2383.
- Wu, G., F. Bazer, T. Davis, L. Jaeger, G. Johnson, S. Kim, D. Knabe, C. Menger, T. Spencer, Y. Yin. 2007. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livest. Sci.* 112: 8-22.
- Wu, G., F. Bazer, T. Davis, S. Kim, P. Li, J. Rhoads, M. Satterfield, S. Smith, T. Spencer, Y. Yin. 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 37: 153-168.
- Wu, G. 2010. Functional amino acids in growth, reproduction and health. *Adv. Nutr.* 1: 31-37.
- Wu, G., Z. Wu., Z. Dai, Y. Yang, W. Wang, C. Liu, B. Wang, J. Wang, Y. Yin. 2013. Dietary requirements of „nutritionally non-essential amino acids“ by animals and humans. *Amino Acids.* 44: 1107-1113.
- Xia, M., C. Hu, Z. Xu. 2005. Effects of copper bearing monmorillonite on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 118: 307-317.
- Xin, H. and J. Harmon. 1998. Livestock industry facilities and environment: heat stress indices for livestock. *Agriculture and Environment Extension Publications* 163. Iowa State University.

- Yang, X., Z. Jiang, Y. Gong, C. Zheng, Y. Hu, L. Wang, L. Huang, X. Ma. 2016. Supplementation of pre-weaning diet with L-arginine has a carry-over effect to improve intestinal development in young piglets. *Can. J. Anim. Sci.* 96: 52-59.
- Yao, K., Y. Yin, W. Chu, Z. Liu, D. Deng, T. Li, R. Huang, J. Zhang, B. Tan, W. Wang, G. Wu. 2008. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J. Nutr.* 138: 867-872.
- Yu, J., P. Yin, F. Liu, G. Cheng, K. Guo, A. Lu, X. Zhu, W. Luan, J. Xu. 2010. Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and gene expression study. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 156: 119-128.
- Yu, J., S. Peng, D. Luo, J. March. 2012. In vitro 3D human small intestinal villous model for drug permeability determination. *Biotech. Bioeng.* 109(9): 2173–2178.
- Zhan, Z., D. Ou, X. Piao, S. Kim, Y. Liu, J. Wang. 2008. Dietary arginine supplementation affects microvascular development in the small intestine of early-weaned pigs. *J. Nutr.* 138: 1304-1309.